

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Física II
(Fisicoquímica Farmacéutica)



MATERIALES HÍBRIDOS MULTIRESPUESTA
COMO COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE
MEDICAMENTOS ANTICANCERÍGENOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

David Serrano Ruiz

Bajo la dirección de los doctores

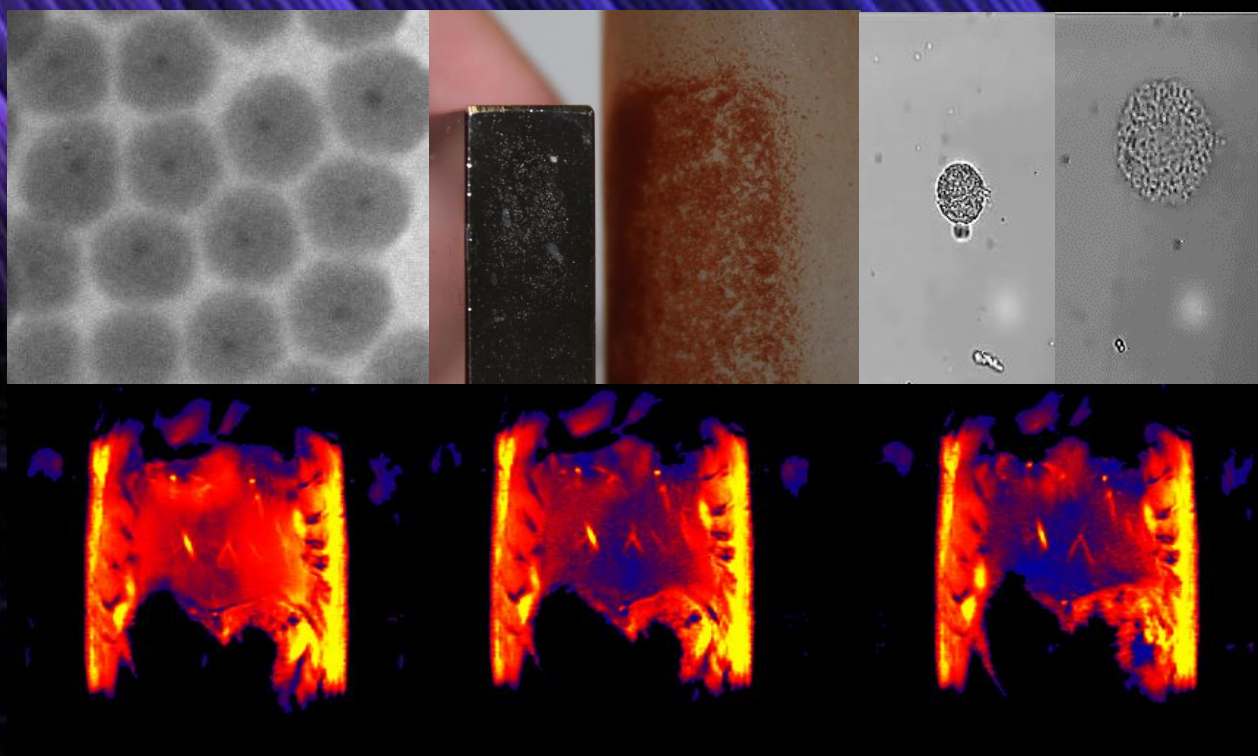
Enrique López Cabarcos
Jorge Rubio Retama

Madrid, 2014



MATERIALES HÍBRIDOS MULTIRESPUESTA COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE MEDICAMENTOS ANTICANCERÍGENOS

TESIS DOCTORAL



DAVID SERRANO RUIZ
MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Física II (Fisicoquímica Farmacéutica)



MATERIALES HÍBRIDOS MULTIRESPUESTA COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE MEDICAMENTOS ANTICANCERÍGENOS

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

David Serrano Ruiz

Bajo la Dirección de los Doctores

Prof. Enrique López Cabarcos

Prof. B. Jorge Rubio Retama

Madrid 2013

*A mi hijo Juan, a mi mujer Vanessa
y a toda mi familia*

AGRADECIMIENTOS

Un trabajo de tesis tan laborioso como este requiere un apoyo que sólo la gente más cercana, y que realmente cree en ti, puede darte. Ante todo quiero agradecerle al Prof. Enrique López Cabarcos el haberme dado la oportunidad de pertenecer a su estupendo grupo de investigación, el haberme guiado con su dirección y dado soporte para que este trabajo pudiera salir adelante y el haberme permitido dejar mi trabajo nocturno, sustituyéndolo por diurno en el grupo; agradecer sin duda también a mi otro director de tesis y amigo Prof. Jorge Rubio Retama, artífice del impulso que me llevó a iniciar este trabajo, espoleador necesario en momentos bajos e ilustrador en mi mente de conocimientos e ideas que no poseía. Sin duda, sin ambos, no hubiera sido posible.

Han sido cinco años de investigación, cuatro de ellos en los que el sueño y la debilidad física y mental, fruto de trabajar de noche en la farmacia e investigar de día en el laboratorio, fueron enemigos muy duros con los que hubo que luchar. Mi lanza en esta cruzada fue sin duda la que empezó siendo mi novia y acabó siendo mi mujer, Vanessa, ayudándome a abatirlos y obteniendo como recompensa no sólo este trabajo, si no también mi hijo Juan que es nuestra alegría de todos los días, pase lo que pase. Mi escudo fueron mis padres y mi hermana, sobre todo un escudo más duro que el kevlar capaz de aguantar todo mi temperamento. Os quiero.

Durante todo este tiempo he tenido la oportunidad de conocer mucha y muy interesante gente, con los que conversar y obtener ideas, pero sin duda son destacables mis dos compañeros y amigos Paulino Alonso y el Dr. Marco Laurenti, personas excelentes, consecuentes, de gran corazón y con un humor incalculable. Los dos, unos investigadores valiosísimos. Gracias a ellos también he podido aprender muchísimo, algo que les agradezco de corazón. He de agradecer también a la Prof. Carmen Rueda, a Jatsue, a Julia, Conchita Civera, Chus, Ángel, Mohammad, Abdulah, Jousuf por haberme dado muy buenos momentos y grandes ánimos; a Conchita Arias y sus hijas Nuria y Laura por esas comidas tan amenas y divertidas en la mayoría de las ocasiones; a Jose por esos buenos momentos en la cafetería.

He de agradecer sin duda a todo el mundo del Departamento de Químico Física II de la Facultad de Farmacia por haber estado siempre ahí para cualquier cosa que necesitase y haberme tratado de manera impecable. Pedro Galera, Begoña Elorza, Francisco García Blanco, Marian Elorza, Conchita Civera, Piedad Yusta, Paz Sevilla, José Luis López Lacomba, Jesús Ruiz Cabello, José González, Visi Sánchez, Miguel Ángel Jiménez, Ángeles Heras, Ignacio Rodríguez....y creo que no me dejo a nadie en el tintero. Agradecer también al departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y en especial a Damiano Rocchi por prestarnos la molécula 2-amino-4,6-difenilbenzoato de etilo para algunos experimentos.

Mención especial a mis profesores de la infancia Don Julio y Don Javier del colegio público Victor Pradera. Sin ellos no hay duda de que no hubiera llegado hasta aquí, su enseñanza en materia de docencia y valores formaron parte de los inmensos pilares que sostienen la persona que soy hoy en día. Nunca dejaré de estar agradecido por que hayan formado parte de mi vida.

Mi memoria ya no es la que era y mis neuronas andan en niveles de paupérrimo rendimiento, así que, por favor, disculpadme a los que no os he nombrado, porque seguro que ha sido por error en las conexiones neuronales.

A todos, sin excepción, muchas gracias.

*"Somos la evolución del Cosmos,
que ha tomado conciencia de sí mismo" - Carl Sagan*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	VI
SUMMARY	1
RESUMEN	8
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	11
1.1. POLÍMEROS Y MICROGELES	13
1.1.1. Introducción	13
1.1.2. Teoría de hinchamiento y aplicación	14
1.1.3. Microgeles interpenetrados	18
1.1.4. Dispersión de neutrones	20
1.1.5. Síntesis de polímeros utilizados en esta tesis	22
-Policaprolactona	23
-Poliacrilamida	24
-Poli (ácido acrílico)	25
-Polietilenglicol	26
-Poliestireno	27
-Poli (2-vinilpiridina)	27
-Microgeles semi-interpenetrados de PAAm y PAAC	28
1.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	29
1.2.1. Introducción	29
1.2.2. Propiedades	29
1.2.3. Magnetismo	30
-Agentes de Contraste en RMI	37
-Hipertermia	40
1.2.4. Síntesis de nanopartículas magnéticas	41
-Síntesis por coprecipitación	41
-Síntesis por descomposición térmica	43
1.3. MATERIALES HÍBRIDOS	45
1.3.1. Introducción	45
1.3.2. Propiedades	46

1.3.3. Síntesis de materiales híbridos para esta tesis	48
-Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un copolímero dibloque de poliestireno y poli(2-vinilpiridina)	48
-Síntesis de un sistema híbrido de policaprolactona con nanopartículas magnéticas vía “injerto desde”	50
-Nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice y funcionalizadas con un copolímero de metoxi-poli(etilenglicol) y policaprolactona	51
1.4. OBJETIVOS	52
1.5. REFERENCIAS DE LA INTRODUCCIÓN	53
Capítulo 2. EMULSIONES MAGNÉTICAS	59
2. RESUMEN	61
2.1 INTRODUCCIÓN	61
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.2.1 Materiales	63
2.2.2 Métodos	63
-Métodos de caracterización	63
-Síntesis del copolímero dibloque PS- <i>b</i> -P2VP	65
-Síntesis de las nanopartículas magnéticas	66
-Síntesis de las nanopartículas magnéticas surfactantes	67
2.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES	67
2.3.1 Caracterización de las Nanopartículas magnéticas	67
2.3.2 Caracterización de las Nanopartículas surfactantes	71
2.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	80
2.5 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	81
Capítulo 3. SISTEMA HÍBRIDO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS	83
3. RESUMEN	85
3.1. INTRODUCCIÓN	85
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	88
3.2.1. Materiales	88

3.2.2. Métodos	88
-Síntesis y modificación en superficie de las nanopartículas magnéticas	90
-Síntesis de la nanopartículas de PCL@Fe ₃ O ₄	90
-Carga del sistema con cumarina	93
3.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES	94
3.3.1. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	94
3.3.2. Caracterización del sistema PCL@Fe ₃ O ₄	97
3.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	105
3.5. REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	106

Capítulo 4. SISTEMA HÍBRIDO BIOCOMPATIBLE 109

4. RESUMEN	111
4.1. INTRODUCCIÓN	111
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	113
4.2.1. Materiales	113
4.2.2. Métodos	113
-Síntesis de las nanopartículas magnéticas	113
-Recubrimiento con sílice	114
-Recubrimiento con GPS	115
-Unión del met-PEG vía “injerto hacia”	115
-Polimerización de la ε-caprolactona “injerto desde”	116
-Carga del sistema con una molécula hidrofóbica	117
4.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES	118
4.3.1. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	119
4.3.2. Caracterización de las nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice y funcionalizadas	121
4.3.3. Aplicación del sistema	127
4.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	129
4.5. REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	130

Capítulo 5. MICROGELES DE PAAc/PAAm Y SU DINÁMICA MOLECULAR	133
5. RESUMEN	135
5.1. INTRODUCCIÓN	136
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	137
5.2.1. Materiales	137
5.2.2. Métodos	138
-Síntesis de los microgeles	138
5.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN	141
5.3.1. Hinchamiento	141
5.3.2. Dispersión de neutrones	143
5.3.3. FTIR-ATR	151
5.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	155
5.5. REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	157
Capítulo 6. CONCLUSIONES GENERALES	161
ANEXOS	165

SUMMARY

INTRODUCTION

Nowadays, technology permits us to synthesize and characterize particles with micro and nanometer size. These particles have an increasing interest in medicine and pharmacology due to their ability to be loaded with high toxicity drugs, that can then be used inside the body minimizing the side effects of these drugs. This is very important when dealing with anticancer drugs because their molecules have a lot of side effects, and sometimes very severe, so the balance risk-benefit is very close. The use of hybrid materials could open a door in this pharmacological world since micro and nanoparticles made with materials of different nature offer the possibility to make a diagnosis and a treatment at once with minimal risks for the patient. These hybrid systems are called "theranostics" and among them stand out those made with polymers joined to inorganic materials like iron oxide nanoparticles, that unify in one system the characteristics of both constituents. It is important to decide which inorganic particles will be part of this system, which polymers will be used, and how to ensemble them, because the combinations will condition in one or other way the hybrid system usability.

AIMS OF THIS WORK

- Synthesis and characterization of new hybrid materials sensitive to external stimuli for applications in drug delivery.
- Control the delivery of drugs loaded in hybrid materials via hyperthermia.

- Development of a polymeric system with UCST behavior and its characterization.

EXPERIMENTAL

MAGNETIC EMULSIONS

The first part of the work begins synthesizing a hybrid system composed by iron oxide magnetic nanoparticles which have been covered with an amphiphilic diblock copolymer of polystyrene (PS) and poly(2-vinylpyridine) (P2VP) with different miscibility. The magnetic nanoparticles were made via coprecipitation method and with transmission electron microscopy (TEM) it was seen that it is possible to obtain higher nanoparticles increasing the temperature of the synthesis reaction. These magnetic nanoparticles were characterized by X-Ray and their crystalline structure corresponds to maghemite. Through superconducting quantum interference devices (SQUID) experiments their superparamagnetic behavior was observed and was seen that the magnetic nanoparticles with 10nm of size showed the highest magnetization, so they were chosen to be functionalized. This functionalization with the PS-*b*-P2VP copolymer was made by “grafting to” technique. The hydroxyl groups on the surface of the magnetic nanoparticles reacted with the dichlorosilane bridge of the copolymer. The hybrid system was studied with infrared spectroscopy (FTIR) and TEM, their sizes were measured with dynamic light scattering (DLS) observing an increase of the hydrodynamic diameter of 34 nm. The amount of polymer grafted was analyzed with thermogravimetry analysis (TGA) and with specific-surface area measurements (BET) it was calculated that an average of 15 chains per nanoparticle were grafted on the surface. The selective miscibility was tested with contact angle technique and an emulsion was made using the hybrid material as surfactant. Finally, the emulsion was submitted to an

external magnetic field in order to observe the response of the magnetic emulsion to the field.

HYBRID SYSTEM FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

In the second part of the work a hybrid system was made using “grafting from” technique. Magnetic nanoparticles synthesized via coprecipitation method were used. They were modified on their surface using sodium citrate in order to increase the number of hydroxyl groups. These hydroxyl groups began the polymerization of a hydrophobic polymer such as polycaprolactone (PCL). The hybrid system was loaded with cumarine to test its suitability as drug carrier, finally it was used *in vivo* in rats to test the capacity of the system as contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI). The magnetic nanoparticles were characterized by TEM and selected area electron diffraction (SAED). The nanoparticles had a size of 6.2 ± 1.2 nm and their crystalline phase was identified as magnetite. Their superparamagnetic behavior was confirmed by SQUID technique. Using FTIR, the surface modification and functionalization with PCL was followed confirming its anchoring. By TEM and TGA, different amounts of PCL on the surface of the nanoparticles were studied. The melting point of the PCL at 47°C was measured by differential scanning calorimetry (DSC), this temperature is close to the one that the magnetic nanoparticles can generate using hyperthermia. With the aim to investigate the release of drug we prepared microparticles by precipitation technique with size 138 ± 49 nm loaded with cumarine. The cumarine release was studied by heating the microparticles and remarking how the release is noticeably increased above 45°C. Moreover, the release was studied using hyperthermia as heating method confirming

that the release is faster when the temperature of the system is increased due to the melting of PCL that permits the release of the cumarine. Finally, the microparticles were injected in rats and were followed by MRI during 1 hour watching their utility as contrast agent in liver.

BIOCOMPATIBLE HYBRID SYSTEM

In the third part of the work, a hybrid system with only one magnetic nanoparticle as core was developed. This magnetic nanoparticle was covered with silica acting as support to functionalize with methoxy-polyethyleneglycol (met-PEG) and different amounts of PCL, via “grafting to” and “grafting from” technique. Glycidoxypropyl trimethoxysilane (GPS) was used as anchoring point since it has an epoxy group very reactive to met-PEG. This one reacts and opens the epoxy group so leave the hydroxyl groups free. Thus, the polymerization of the PCL starts in these hydroxyl groups. The hybrid system was loaded with a very hydrophobic molecule, ethyl 2-amine-4,6-diphenylbenzoate (ADE) with the aim to solubilize it in aqueous media. ADE is a cancer drug precursor. Magnetic nanoparticles synthesized using thermal decomposition technique were characterized by TEM and SAED obtaining monodisperse magnetic nanoparticles with 7 nm of size and crystalline phase of magnetite. After covering with silica, the particles were studied by TEM and their size was 48 nm. By FTIR, TEM and scanning electron microscopy (SEM) the nanoparticles were characterized after the functionalization with met-PEG and PCL, observing how the particles become surrounded with increasing amounts of polymer and seeing aggregates when the polymer was in excess. By DLS the hydrodynamic diameter was checked, it varied from

60 to 165 nm as increasing the amount of PCL. The hybrid system was loaded with ADE, which permits an easy visualization due to its fluorescence, and was dispersed in water in order to test the solubilization of the molecule thanks to the hybrid system. Taking advantage of the magnetic properties, the entire system was precipitated and recovered with an external magnetic field.

PAAc/PAAm MICROGELS AND THEIR MOLECULAR DYNAMICS

Finally, a semi-interpenetrated network was synthesized. Poly(acrylic acid) (PAAc) was polymerized with a cross linker in a solution that contained linear polyacrylamide (PAAm), with the aim to study the existing interactions between both polymers in the microgel particle. These interactions permit an upper critical solution temperature (UCST) behavior where the microgel gets swollen when the temperature is increased. Different ratios in composition of PAAc/PAAm were synthesized to study them. The system was characterized by SEM, optical microscopy, neutron scattering and FTIR-ATR (FTIR with an attenuated total reflexion device). The microgels swelling was studied in different pH obtaining as a result that the highest swelling exists at pH 3. At pH 3 and at temperature range of 17-57°C the optimal ratio PAAc/PAAm was studied. The best differential swelling was provided by the composition PAAc/PAAm 50/50. Through neutron scattering the segmental chains movements were studied. It was observed that the vibrational oscillations of the polymer chain segments increased gradually. This could be explained due to the interactions among the polymer chains. When heating, these interactions get broken increasing the vibrational oscillations amplitude. The diffusion coefficients of the polymer chains were studied with the

different compositions at 17°C and 57°C. It was observed that the highest variation in the coefficients was given by the composition 50/50. This indicated that the interactions among the chains acted as cross linkers, and they break when the system is heated. Then, the elastic tension decreased raising the diffusion coefficients. Microgels with neat PAAm, neat PAAc and PAAc/PAAm 50/50 were studied by FTIR-ATR in collapsed state (17°C) and swollen state (57°C). There were changes in the carbonyl group environment of the PAAc and PAAm. So, when the temperature was increased, the peak from amide I at 1635 cm^{-1} assigned to the interaction $\text{C}=\text{O}\cdots\text{OH}$ grew up. After the interactions were broken, the matrix of the microgel got swollen increasing the interactions with water. The band at 1724 cm^{-1} assigned to $\text{C}=\text{O}$ of the PAAc decreased because the interactions $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ were substituted by interactions $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ with water, this effect was confirmed with the increased component at 1712 cm^{-1} corresponding with the interaction with water. These interactions due to hydrogen bonds got broken when the system is heated, changing the inter chain interactions with interactions with water that got into the matrix microgel while it was swelling.

CONCLUSIONS

1. It was possible to make an emulsion sensible to external magnetic fields using a model hybrid material made of iron oxide nanoparticles functionalized with copolymers of polystyrene-*b*-poly(2-vinylpyridine)
2. A theranostic system was proposed. It was synthesized using the “grafting from” technique. PCL locks were grown on the Surface of magnetic nanoparticles. This system was loaded with cumarine testing its capacity as drug delivery using

hyperthermia. The suitability of the system was tested as contrast agent and “in vivo” assays were made with rats. Furthermore, the system was followed into the organism by MRI.

3. With the aim to improve the previous systems, a hybrid system with a single magnetic nanoparticle core, covered with silica and functionalized via “grafting to” and “grafting from”, was made. The polymers anchored were met-PEG and PCL. This system was loaded with the hydrophobic cancer precursor, ADE and was able to solubilize it in aqueous media. Furthermore, it was possible to recover the drug using an external magnetic field.
4. Semi-interpenetrated network microgel with UCST behavior was studied by neutron scattering and FTIR-ATR. The swelling behavior was studied at different temperatures and different microgel compositions of PAAc and PAAm and was attributed to interchain interactions by hydrogen bonds. These hydrogen bonds are sensible to the increasing temperature that provokes its rupture and the increment in the diffusion coefficients of the polymer chains allowing the water to enter into the system, swelling the microgel and increasing its volume.

RESUMEN

La obtención de sistemas híbridos es una tarea relativamente compleja que conlleva el aunar las propiedades deseadas de los distintos componentes que vayan a conformar el sistema. Es importante decidir qué tipo de partículas inorgánicas formarán parte de dicho sistema, qué tipo de polímeros se usarán, y cómo se ensamblarán todos ellos, puesto que las combinaciones condicionarán en un sentido u otro la utilidad del sistema híbrido.

En este trabajo se ha comenzado estudiando un sistema híbrido compuesto por un núcleo inorgánico de nanopartículas magnéticas, las cuales se han recubierto con un copolímero dibloque anfifílico de poliestireno y poli(2-vinilpiridina). Se ha podido comprobar que este sistema puede actuar como surfactante formando emulsiones en las cuales las nanopartículas magnéticas quedan situadas en la interfaz de la misma, orientándose los polímeros hacia el solvente en el cual son miscibles, estabilizando la emulsión. Aprovechando el núcleo magnético, se puede dirigir esta emulsión gracias a un imán.

En otro de los capítulos de este trabajo, se emplearon nanopartículas magnéticas que se funcionalizaron con un polímero biocompatible y biodegradable como es la policaprolactona. El sistema nanopartícula magnética – policaprolactona se probó como transportador de compuestos lipofílicos cargándolos con una molécula fácilmente detectable como es la cumarina, la cual podría liberarse del seno del sistema por inducción magnética, proceso por el cual se eleva la temperatura fundiendo la policaprolactona y permitiendo así la salida del compuesto atrapado en ella. Para comprobar la viabilidad del sistema, se realizaron experimentos en ratas dónde se pudo

realizar un pequeño seguimiento del sistema híbrido a través de resonancia magnética de imagen.

Una alternativa mejor al sistema propuesto la conseguimos al sintetizar un sistema híbrido con un núcleo compuesto de una sola nanopartícula de hierro recubierta de sílice, el cual se modificó para poder anclar en su superficie dos polímeros biocompatibles y de distinta miscibilidad: metoxi-poli(etilenglicol) y policaprolactona. Este sistema es capaz de transportar compuestos antitumorales hidrofóbicos que quedan atrapados en la policaprolactona, mientras que el metoxi-poli(etilenglicol) aporta estabilidad coloidal al sistema híbrido en medios acuosos como lo son los biológicos.

Finalmente y para entender el movimiento de los polímeros cuando estos están afectados por cambios del entorno como el aumento de temperatura, hemos estudiado un sistema semi-interpenetrado de microgeles de poli(acrilamida) y poli(ácido acrílico). Estos microgeles interpenetrados tienen la característica de aumentar su volumen con el incremento de temperatura. Este aumento de volumen da lugar a un aumento del tamaño de poro de la red polimérica, lo que se traduce en un incremento en la salida de principios activos si este sistema se cargara con ellos. Para comprender los procesos fisicoquímicos que se llevan a cabo en este comportamiento, se realizaron estudios de dispersión de neutrones y espectroscopía infrarroja fundamentalmente, donde se pudo observar que el aumento de temperatura rompe interacciones intercatenarias permitiendo la entrada de agua en el gel, hinchándolo y aumentando su volumen.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, la tecnología nos permite llevar a cabo la síntesis y caracterización de partículas de tamaño micro y nanométrico¹⁻⁴. Este tipo de partículas tienen un creciente interés en el mundo de la medicina y farmacología dada su capacidad de poder ser cargadas con principios activos de alta toxicidad y para ser empleadas en zonas de interés dentro del organismo⁵⁻¹², minimizando los efectos adversos de estos medicamentos. Esto es especialmente importante en el caso de medicamentos anticancerígenos, ya que sus principios activos tienen efectos secundarios, en muchos casos, de suma gravedad haciendo que el balance beneficio-riesgo sea muy ajustado. El empleo de estos materiales podría abrir una puerta realmente importante en este mundo farmacológico. Para ello se lleva a cabo la fabricación de sistemas híbridos que empleen varias partículas de distinta naturaleza con el fin de poder diagnosticar y tratar al unísono al paciente con el mínimo riesgo para él. Estos sistemas reciben el nombre de “teranósticos”¹³⁻²⁰ y entre ellos cabe destacar los formados por polímeros unidos a materiales inorgánicos como nanopartículas de óxido de hierro que aúnan en un sistema, las características de ambos.

1.1- POLÍMEROS Y MICROGELES

1.1-1. Introducción

Lo propio de las macromoléculas es su elevado tamaño molecular, que les confiere propiedades peculiares. Los polímeros son macromoléculas compuestas por

unidades repetitivas de unidades más pequeñas a las que se les denomina monómero²¹, las cuales se unen entre sí por enlaces covalentes. Cuando los monómeros son la misma molécula, se obtienen homopolímeros; mientras que si se compone de más de un monómero distinto, se denominan heteropolímeros. Los polímeros pueden ser lineales cuando los monómeros se alinean en una sola cadena; ramificados cuando esa linealidad se rompe al permitir el monómero la formación de cadenas laterales a la vez que sigue manteniendo una estructura plana, como si de una capa se tratase; y entrecruzados, cuando los enlaces covalentes son más de uno y permiten la generación de una estructura tridimensional. Otro tipo de estructuras la constituyen los copolímeros, que son macromoléculas compuestas por la unión de dos o más polímeros diferentes que se unen en un mismo punto por un extremo, o pueden estar formados por cadenas de dos o más polímeros de distinta composición que se unen de forma seriada, uno tras otro.

Por microgel se entiende a un sistema coloidal polimérico en la cual la fase continua está constituida por un solvente y la fase discontinua es el polímero. Cuando este solvente es agua, se habla de hidrogeles. En determinadas circunstancias, y gracias a distintos estímulos como la temperatura, el pH, la fuerza iónica etc..., estos microgeles pueden pasar de un estado hinchado a otro colapsado, les induce cambios en su comportamiento de hidrofília-lipofilia²², en su tamaño^{23,24}, conductividad²⁵, etc.

1.1-2. Teoría de hinchamiento y aplicación

Una de las características más interesantes de algunos microgeles es la de absorber agua del medio e incrementar su volumen. Esta propiedad depende de factores externos como es el pH, temperatura, fuerza iónica, campos eléctricos, etc., y

puede ser controlada de forma exógena lo que permite aplicar esto a: i) el control de la liberación de principios activos²⁶, ii) el desarrollo de músculos artificiales²⁷ y iii) la formación de cristales fotónicos con propiedades ópticas ajustables²⁸.

Atendiendo a Flory²⁹ y Tanaka³⁰, el comportamiento de hinchamiento de un gel se puede describir macroscópicamente, estableciendo un analogía entre el equilibrio de hinchamiento y el equilibrio osmótico, en función de su presión osmótica total;

$$\pi = \pi_{elas} + \pi_{mez} + \pi_{ion} \quad [1.1]$$

donde π_{elas} , representa el componente de la presión osmótica elástica que depende del grado de reticulación del gel y que reduce el hinchamiento del mismo. π_{mez} , representa el componente relacionado con la interacción existente entre el solvente y las cadenas de polímero y que afecta de forma positiva en el hinchamiento del gel. Por último, π_{ion} está relacionado con la interacción entre las partes cargadas del gel y el solvente. La reacción elástica de la estructura de la red del gel puede interpretarse como una acción de presión sobre la solución.

La π_{elas} la describe Flory como:

$$\pi_{elas} = RT \left(\frac{\nu_e}{V_0} \right) \left[\frac{V_0}{2V} - \left(\frac{V_0}{V} \right)^{1/3} \right] \quad [1.2]$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, ν_e son el número de moles de las cadenas elásticamente efectivas en la red, V_0 es el volumen del polímero no hinchado y V es el volumen del gel hinchado.

La π_{mez} puede describirse como:

$$\pi_{mez} = -\frac{RT}{\nu_s} [\phi + \ln(1 - \phi) + \chi\phi^2] \quad [1.3]$$

donde ν_s es el volumen molar del solvente, ϕ es la fracción de volumen de las cadenas del polímero y χ es el parámetro de interacción polímero-solvente de Flory. Este parámetro controla la transición de fase del estado colapsado al hinchado ya que expresa el cambio de energía libre que ocurre cuando el solvente pasa de estar solo a tener polímero en su seno:

$$\chi = \frac{\Delta G_{mez}}{kT} = \frac{\Delta H_{mez} - T\Delta S_{mez}}{kT} \quad [1.4]$$

Si los polímeros que constituyen el microgel contienen grupos cargados, hay que tener en cuenta el factor iónico, la carga que tengan los polímeros, las cuales pueden incrementar en gran medida el hinchamiento del gel. Las cargas del polímero o polímeros que constituyen la red del microgel favorecen su hinchamiento debido a las repulsiones electrostáticas que generan, por eso según se aumenta el grado de neutralización de las cargas, las repulsiones disminuyen conduciendo a un menor hinchamiento del microgel. Así, π_{ion} según Tanaka³⁰ puede describirse como:

$$\pi_{ion} = \nu f k T \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right) \quad [1.5]$$

donde ν es el número efectivo de cadenas por unidad de volumen cuando $\phi = \phi_0$, siendo ϕ_0 la fracción de volumen de la red en un estado de referencia (cuando las cadenas que constituyen el polímero tienen una configuración de movimiento aleatorio³⁰); y f es el número de contraiones por número de cadenas efectivas en la red.

Dentro del comportamiento de los polímeros con el solvente en el que se encuentran, vamos a encontrar sistemas que presentan comportamiento LCST (Temperatura de Solución Crítica Inferior) y otros con comportamiento UCST (Temperatura de Solución Crítica Máxima). Los sistemas con LCST tienen la característica de ser sensibles a aumentos de temperatura de manera que al elevarse ésta, el polímero o sistema interpenetrado polimérico colapsa disminuyendo su volumen^{31,22}; por el contrario, con comportamiento UCST experimentan una expansión, un aumento de su volumen si la temperatura se eleva^{23,24}. LCST y UCST son las respectivas temperaturas críticas por debajo y por encima de las cuales el polímero y el solvente son completamente miscibles. Así por ejemplo, una solución con un polímero o copolímero con comportamiento LCST, por debajo de su LCST tiene una apariencia clara y homogénea (una fase), mientras que por encima de su LCST aparece nebuloso debido a su colapso (dos fases). Esto sucede porque la variación de energía libre del sistema, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ es negativa cuando se incrementa la temperatura, debido fundamentalmente a que la variación de entropía del sistema es positiva. Cuando el polímero no está disuelto, el agua está menos ordenada y tiene una mayor entropía. El comportamiento LCST es un efecto dirigido entrópicamente, mientras que UCST es un efecto dirigido de forma entálpica²⁴.

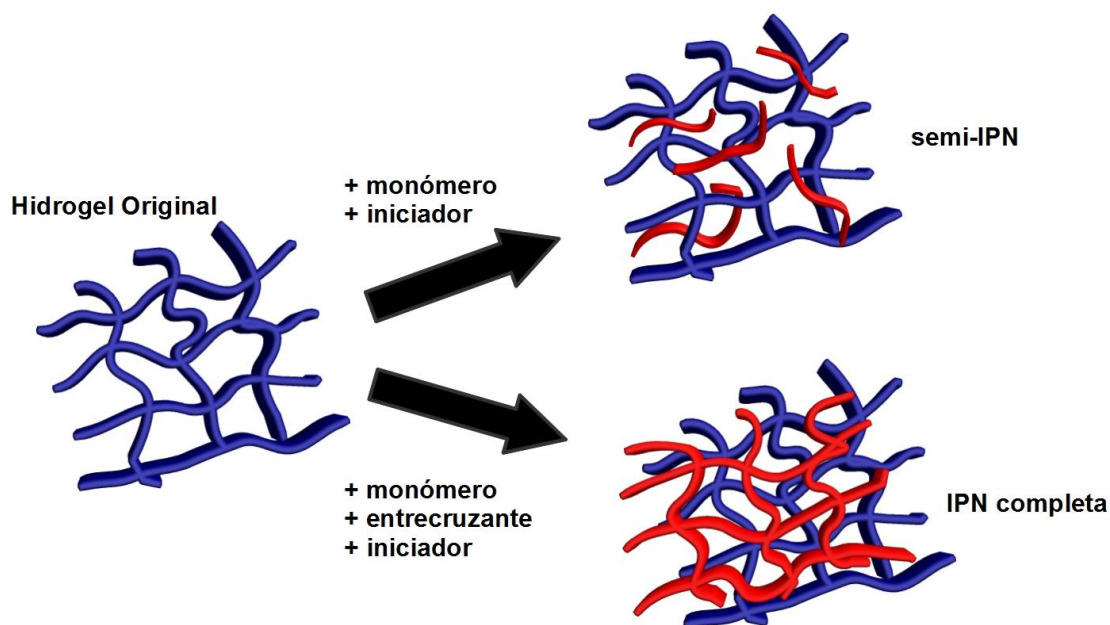
La propiedad de que los microgeles se puedan hinchar y deshinchar puede tener utilidad en el transporte y liberación de principios activos. Un microgel puede actuar como un buen transportador de fármacos manteniendo la molécula en el interior de su matriz polimérica. La liberación del principio activo puede hacerse por dos modos, mediante el colapso del microgel o mediante el hinchamiento del mismo. En el primer

caso, al colapsarse la matriz polimérica del microgel, las moléculas de principio activo serían liberadas al medio exterior como si de una bomba de expulsión se tratase, siendo así útil en el caso de necesitar liberar un principio activo en una dosis única. En el segundo caso, el hinchamiento del microgel propiciaría la formación de poros en la red polimérica de mayor tamaño permitiendo la entrada de agua en el sistema y la salida del principio activo por difusión simple. Este último sería más útil para el caso de necesitar modular la liberación del principio activo, ya que ésta sería una liberación continuada y con una dosificación modulada por el tamaño del poro generado en la matriz del polímero que constituye el microgel.

Microgeles interpenetrados

Las redes interpenetradas poliméricas son un tipo de microgel compuesto por polímeros entrecruzados^{32,33}. Se sintetizan de la siguiente forma: en un paso inicial, se produce la polimerización de uno de los monómeros en presencia de un agente entrecruzante de manera que en vez de un polímero lineal, se consigue sintetizar una red de polímero. En un siguiente paso se produce la polimerización del otro monómero en el seno del polímero entrecruzado anteriormente sintetizado y en presencia también de un agente entrecruzante. Así, la red entrecruzada del último polímero se encontrará entremezclada en la red del polímero entrecruzado inicial. La cantidad de agente reticulante empleada en las síntesis, va a ser determinante de la cantidad o tamaño de poro que habrá en el gel interpenetrado, característica que habrá que tener en cuenta. Para la obtención de geles semi-interpenetrados se pueden seguir dos vías que conducen al mismo resultado: o bien se polimeriza un monómero en ausencia de un

agente reticulante pero con un polímero entrecruzado previamente ya en el medio; o bien se polimeriza un monómero en presencia de un agente reticulante en un medio que contenga el otro polímero ya sintetizado pero sin reticulamientos. En ambos casos se consigue obtener un sistema entrecruzado en el que uno de los polímeros está en forma lineal. En un gel semi-interpenetrado se tienen menos entrecruzamientos, por lo que hay mayor libertad de movimiento en las cadenas de los polímeros siendo así el gel menos rígido.



Esquema 1.1. Representación esquemática de la formación de una red semi-interpenetrada (semi-IPN) y una red interpenetrada completa (IPN)

Como ejemplo de redes interpenetradas nos encontramos con las formadas por poli(acrilamida) (PAAm) y poli(ácido acrílico) (PAAc) que son de gran interés por ser de los pocos sistemas que presentan comportamiento UCST³⁴, lo que implica que el microgel se expande por acción de la temperatura, aumentando su tamaño de poro, liberando las sustancias que contengan en su interior.

1.1-3 Dispersión de Neutrones

Para el estudio de los movimientos de las cadenas de los microgeles sintetizados en esta tesis, se utilizó la técnica de dispersión de neutrones. De las medidas de dispersión de neutrones se obtiene la sección eficaz de dispersión doble diferencial³⁵ $d^2\sigma/d\Omega dE$ la cual es proporcional a las funciones de dispersión coherentes $S_{coh}(Q, \omega)$ e incoherentes $S_{inc}(Q, \omega)$. La sección eficaz de dispersión incoherente de los hidrógenos es mayor en comparación con las secciones eficaces de dispersión coherente e incoherente del resto de los átomos de la muestra como carbono, oxígeno y nitrógeno. Para los microgeles interpenetrados de PAAC/PAAm sintetizados en esta tesis, el ratio $\sigma_{inc}(H)/\sigma_{inc}(\text{total})$ es 0.9997. La señal $S_{inc}(Q, \omega)$ se mide de los átomos de hidrógeno de forma que podemos inferir en la dinámica de las cadenas poliméricas en las que los hidrógenos están anclados^{36,37}. La sección eficaz incoherente del deuterio es baja (2.05 barn) en comparación con el hidrógeno (80.26 barn). Sin embargo, aunque esta contribución es pequeña en muestras diluidas, es relevante ya que la cantidad de dispersión incoherente proveniente del agua pesada usada como solvente es del mismo orden de magnitud que la señal proveniente de los hidrogeles. La dinámica de las moléculas del agua pesada es más rápida que la dinámica de la cadena polimérica y ambas contribuciones se pueden separar.

La dinámica en sistemas poliméricos resulta de la superposición de movimientos vibracionales, rotacionales y traslacionales³⁸⁻⁴⁰. Se asume que las escalas de tiempo son lo suficientemente distintas para ser desacopladas, de forma que en las características del espectro IQNS característico de estos distintos movimientos aparecen separados en las regiones $-\omega$. Además, cualquier movimiento rotacional es normalmente muy rápido

en la escala de tiempo de los movimientos de difusión de los segmentos de cadena polimérica, formando un fondo plano de baja intensidad que se puede separar cuando se usa un espectrómetro de alta resolución como IN10. Para el análisis de datos se ha considerado que el movimiento molecular en el rango de energía experimental está compuesto por la combinación de procesos difusivos y vibracionales de los segmentos de cadena polimérica. Si los movimientos están desacoplados, la función de dispersión incoherente $S_{inc}(Q, \omega)$ se puede describir por:

$$S_{inc}(Q, \omega) = S_{inc}^{vib}(Q, \omega) \otimes S_{inc}^{segm}(Q, \omega) \quad [1.6]$$

donde \otimes significa el producto de convolución (teniendo en cuenta que la contribución inelástica está bien separada de la quasielástica).

$S_{inc}^{vib}(Q, \omega)$ es la función de dispersión incoherente para los movimientos vibracionales, se corresponde con el factor elástico de Debye-Waller. Se puede aproximar a:

$$S_{inc}^{vib}(Q, \omega = 0) = e^{-\left(\frac{1}{3}\langle u^2 \rangle Q^2\right)} \cdot \delta\omega \quad [1.7]$$

dónde $\langle u^2 \rangle$ es la amplitud cuadrática media de la vibración del protón, Q es el vector de dispersión y $\delta\omega$ es la función delta de Dirac. Para procesos difusivos S_{inc}^{segm} viene dada por la contribución quasielástica:

$$S_{inc}^{segm}(Q, \omega) = L(\omega, \Gamma(Q)) \quad [1.8]$$

dónde $L(\omega, \Gamma(Q))$ es una función lorentziana con la mitad de la anchura a la mitad del máximo $\Gamma(Q)$. Para procesos difusivos que siguen la Ley de Fick, se cumple que

$\Gamma(Q) = \hbar \cdot D_c \cdot Q^2$ (donde D_c es el coeficiente de difusión). La función de dispersión incoherente puede finalmente escribirse como:

$$S_{inc}(Q, \omega) = e^{-\left(\frac{1}{3} \langle u^2 \rangle Q^2\right)} \cdot \delta\omega \otimes \frac{1}{\pi} \left(\frac{D Q^2}{(D Q^2)^2 + \omega^2} \right) \quad [1.9]$$

La escala espacial de los movimientos vibracionales (raíz cuadrada de la amplitud cuadrática media $\langle u^2 \rangle^{1/2}$) se obtiene de $S_{inc}(Q, \omega = 0)$ a una temperatura fija y el coeficiente de difusión se puede derivar del ajuste del componente cuasielástico de los patrones IQNS.

1.1-4 Síntesis de polímeros utilizados en esta tesis

Las síntesis de los polímeros⁴¹ se van a realizar por medio de la unión covalente seriada de sus monómeros. Estas uniones pueden llevarse a cabo por medio de radicales (polimerización radicalaria), cationes (polimerización catiónica) o aniones (polimerización aniónica). Toda síntesis polimérica se va a componer, de modo general, por tres fases:

-Iniciación, en la cual se activan o forman los monómeros.

-Propagación, en la cual se produce la unión en cadena de los monómeros.

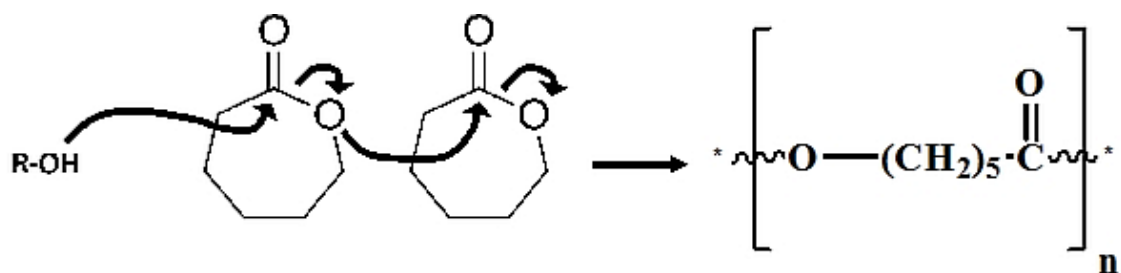
-Terminación, en la cual se finaliza la polimerización bien por agotamiento de los monómeros, bien por el empleo de métodos químicos.

A continuación se describen los polímeros utilizados en este trabajo y cómo suelen sintetizarse habitualmente.

Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es un polímero formado por la repetición de monómeros que se obtienen por la apertura del anillo de ϵ -caprolactona. Tiene la característica de ser un polímero biocompatible⁴², semicristalino y con un punto de fusión bajo de alrededor de 56 °C⁴³, el cual dependerá de su peso molecular. Es un polímero insoluble en agua, medio en el cual colapsa pudiendo ser así útil para atrapar entre sus cadenas a sustancias insolubles en solventes acuosos. Su uso está aprobado por la FDA para aplicaciones biomédicas como polímero para liberación de principios activos⁴⁴, ingeniería de tejidos⁴⁵, suturas⁴⁶, etc.

La reacción de polimerización de la PCL puede llevarse a cabo empleando un nucleófilo como pudiera ser un grupo hidroxilo como iniciador. Este grupo atacaría al carbono del carbonilo de la ϵ -caprolactona abriendo el anillo y liberando un nuevo grupo OH. Este nuevo grupo hidroxilo atacaría al carbonilo del siguiente monómero propagando así la reacción como se muestra en el Esquema 1.2.

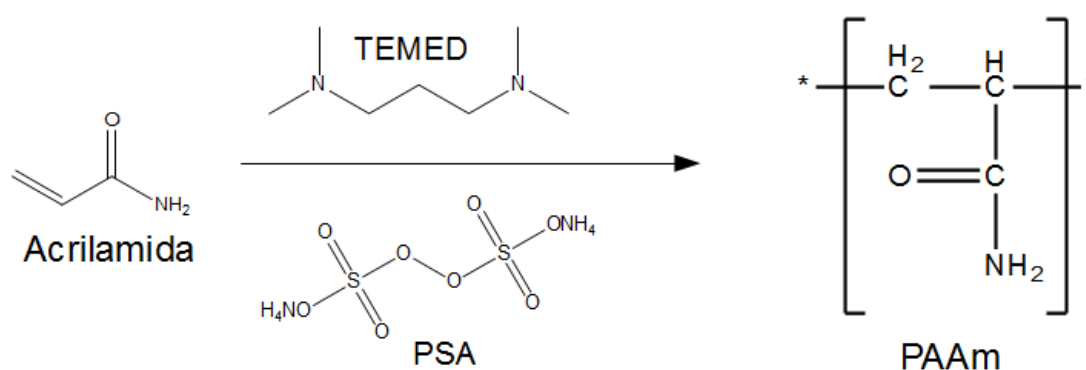


Esquema 1.2. Esquema de polimerización de la ϵ -caprolactona

Poliacrilamida

La poliacrilamida (PAAm) es un polímero soluble en agua y con una gran capacidad de hinchamiento pudiendo formar fácilmente un gel. Alguno de sus usos han sido aprobados por la FDA⁴⁷ y son bastante variados en el mundo de la medicina, como inmovilizadora de enzimas, transportadora y liberadora de principios activos, formar parte de geles sensibles a estímulos externos, matrices extracorporales para eliminar toxinas, etc.⁴⁷

La polimerización de la PAAm se puede se llevar a cabo a través de una reacción de polimerización radicalaria, como por ejemplo la realizada utilizando el monómero acrilamida, peroxodisulfato amónico (PSA) como generador de radicales y tetraetil metilendiamina (TEMED) como catalizador. Los radicales que dona el PSA son cedidos a la parte del vinilo de la acrilamida, generando en ella un nuevo radical que ataca al vinilo de la siguiente acrilamida propagando así la reacción, ver Esquema 1.3.

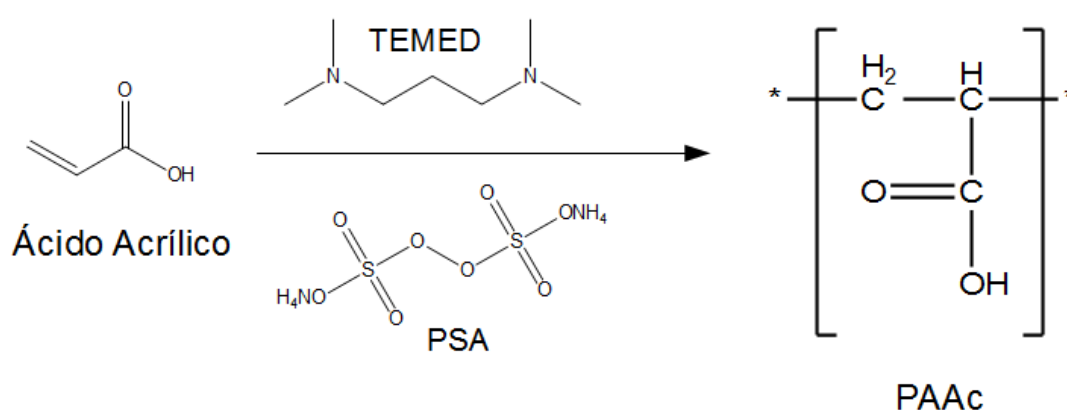


Esquema 1.3. Esquema de la síntesis clásica de la poliacrilamida

Poli (ácido acrílico)

El poli(ácido acrílico) (PAAc) es un polímero no tóxico y aprobado por la FDA para variadas aplicaciones biomédicas y farmacológicas como liberadores de principios activos anestésicos, antitumorales, antifúngicos, o como rellenos de refuerzo en adhesivos dentales en odontología⁴⁸⁻⁵¹. Es soluble en agua, pero al tener grupos carboxílicos laterales, hay que tener en cuenta el pH del medio. El PAAc tiene un pKa de 4.5^{52,53}, por lo que un pH superior al pKa conllevará una mayor proporción de grupos carboxílicos desprotonados aumentando la repulsión electrostática y disminuyendo la cantidad de enlaces de puente de hidrógeno que pudieran producirse.

La polimerización del ácido acrílico se realiza por la vía radicalaria, de manera similar a la de la acrilamida puesto que el monómero es muy semejante. Para ello se utilizan igualmente tanto PSA como TEMED, típicos en las polimerizaciones radicalarias. En el Esquema 1.4 se resume la síntesis del PAAc.

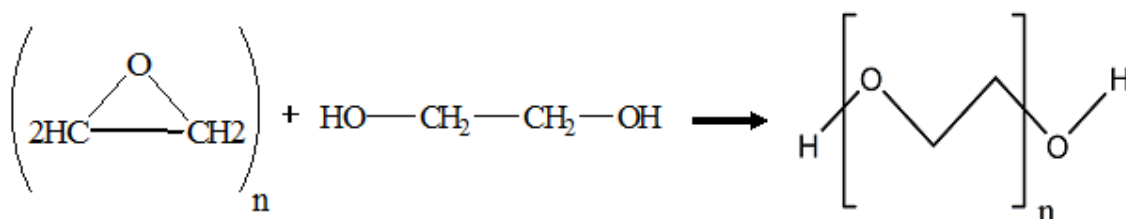


Esquema 1.4. Esquema de síntesis del polímero poli (ácido acrílico).

Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un polímero biocompatible, aprobado en numerosas aplicaciones por la FDA⁵⁴, con una solubilidad en agua muy alta, por lo que suele ser ideal para su uso en medios biológicos y su empleo es tan frecuente en el ámbito de la biomedicina que se le denomina PEGilación⁵⁵. Es un buen agente para recubrir nanopartículas ya que esta cubierta permite ocultarlas al sistema retículo endotelial⁵⁶, evitando así que sean opsonizadas por macrófagos y eliminadas del organismo de forma rápida⁵⁷ pudiendo mantener el sistema el mayor tiempo dentro del organismo. Se usa tanto en biomedicina como en cosmética y por sí mismo como laxante, entre sus muchas aplicaciones.

El polietilenglicol (PEG) es uno de los polímeros más versátiles y utilizados en el mundo científico. Su síntesis suele realizarse a partir del óxido de etileno con etilenglicol (que permite obtener una mayor monodispersidad), utilizando un catalizador aniónico que permite la obtención de polietilenglicol con menos polidispersidad que si se utiliza una polimerización catiónica, ver Esquema 1.5.

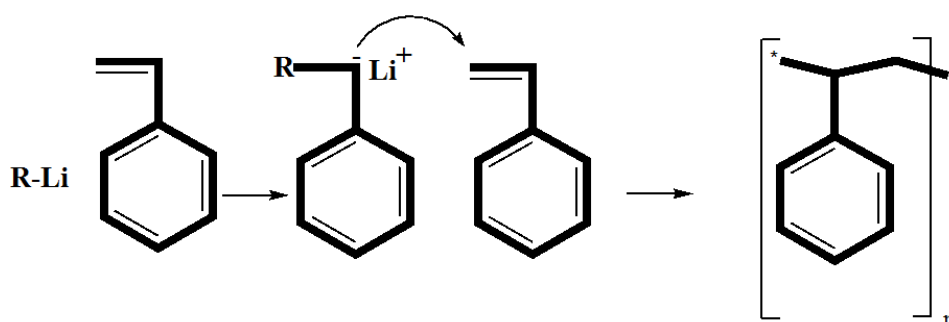


Esquema 1.5. Síntesis de PEG

Poliestireno

El poliestireno (PS) es un polímero cuya aplicación está enfocada fundamentalmente en la industria^{58,59}, dada su estructura no biodegradable, su rigidez y su insolubilidad en medios acuosos. No es un producto biocompatible, pero es útil a veces en investigación como polímero modelo⁶⁰.

Tal como se muestra en el Esquema 1.6, la síntesis del poliestireno se va a llevar a cabo mediante una polimerización aniónica a partir del estireno tras su activación con un organometálico, el cual da lugar a un carbono nucleófilo que atacará el grupo vinilo del siguiente estireno, propagando la reacción.

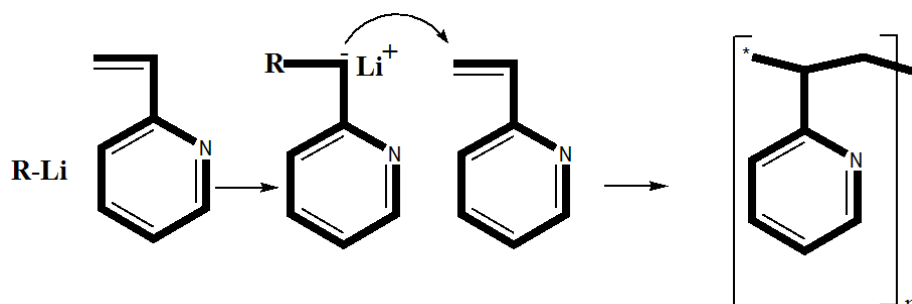


Esquema 1.6. Polimerización del poliestireno

Poli (2-vinilpiridina)

La poli(2-vinilpiridina) (P2VP) es un polímero soluble en agua, cuya solubilidad va a ser dependiente del pH del medio puesto que su pK_a es de 4.7⁶¹. A pH ácidos se obtiene un grupo piridinio que permite su solubilización en dicho medio. La P2VP junto al poliestireno, suelen formar parte de copolímeros tipo en investigación⁶² aprovechando las propiedades de miscibilidad selectiva de ambos.

Dada su similitud estructural con el poliestreno, la polimerización de la poli (2-vinilpiridina) (P2VP) es prácticamente idéntica: una polimerización aniónica de la 2-vinilpiridina activada a partir de un organometálico. Ver Esquema 1.7.



Esquema 1.7. Polimerización de la poli (2-vinilpiridina)

Microgeles semi-interpenetrados de PAAm y PAAC

Se llevaron a cabo síntesis de microgeles con los polímeros biocompatibles PAAm y PAAC. Estos microgeles presentan comportamiento UCST. La síntesis se llevó a cabo en dos pasos. Inicialmente se realizó la síntesis de la PAAm vía polimerización radicalaria, obteniéndose cadenas lineales. En un segundo paso, se polimerizó PAAC vía radicalaria pero utilizando un agente reticulante, el N,N-metilenbisacrilamida. Esta polimerización se realizó en el medio de la PAAm previamente sintetizada. De esta forma, los entrecruzamientos del PAAC provocan el atrapamiento de la PAAm en su red generando el microgel semi-interpenetrado como el representado en el Esquema 1.1. Así, interaccionan las cadenas de PAAC con las de PAAm. Esta interacción es la responsable del comportamiento UCST del microgel.

1.2- NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

1.2-1. Introducción

Se pueden considerar nanopartículas a todas aquellas partículas cuyo tamaño esté comprendido alrededor de los 4 y los 200 nm. Hay cierta controversia con ello puesto que hay autores que consideran nanopartículas todas aquellas cuyos tamaños empiezan desde 1 nm⁶³, mientras que otros autores, tamaños entre 1 y 4 nm los consideran clústeres⁶⁴. De igual forma que hay autores³ que consideran nanopartículas a aquellas que tienen tamaños inferiores a los 100 nm. Dentro de las nanopartículas, las magnéticas van a tener propiedades muy interesantes y pueden tener aplicaciones en medicina y farmacología ya que pueden dotar de magnetismo a los transportadores de principios activos⁶⁵, usarse como agentes de contraste en técnicas médicas de imagen⁶⁶, e incluso usarse como un tratamiento propio mediante hipertermia⁶⁷.

1.2-2. Propiedades

La ventaja del uso de las nanopartículas es su tamaño, el cual permite tener una elevada superficie específica. Además, por su tamaño nanométrico van a poder circular por el organismo sin provocar lesiones tromboembólicas e incluso podrán acceder directamente al interior celular. La disminución de tamaño de las nanopartículas permite observar comportamientos distintos a su equivalente en tamaño macrométrico que pueden resultar interesantes.

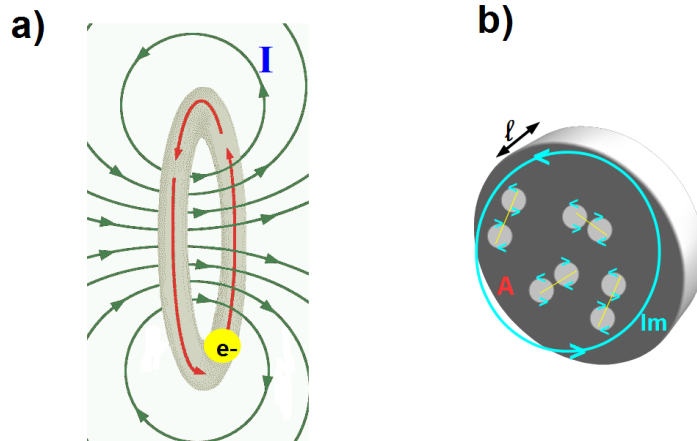
El principal problema que tienen las nanopartículas va a ser su estabilidad coloidal, puesto que tienden a agregarse y precipitar. Para evitarlo, se recurre a la

modificación de su superficie siguiendo tres estrategias; i) estabilización mediante cargas, funcionalizando la superficie con carboxilatos o fosfatos⁴, ya que estas cargas estabilizarán las partículas mediante repulsión, de manera que evitan la agregación de las mismas; ii) estabilización por impedimento estérico, que se lleva a cabo principalmente con polímeros⁴, los cuales actuarán como una barrera física entre las partículas; iii) estabilización con materiales inorgánicos como sílice⁶⁸, que generan una corteza de materiales casi inertes alrededor de las partículas. A su vez, estas funcionalizaciones pueden ayudar a proteger a las partículas químicamente al evitar que sean atacadas por compuestos reactivos a las mismas, y además protegen al organismo de su posible toxicidad.

1.2-3. Magnetismo

Siempre que fluye una corriente eléctrica, se produce un campo magnético. El magnetismo es un fenómeno asociado con los campos magnéticos que existen alrededor de un cuerpo magnético o un conductor portador de corriente eléctrica. Por ello, tanto el movimiento orbital como fundamentalmente el spin de los electrones de un material van a ser equivalentes a pequeños bucles de corriente, gracias a los cuales en los átomos individuales se generan campos magnéticos a su alrededor. El momento magnético de un átomo es la suma vectorial de los momentos magnéticos de los movimientos orbitales y spin de sus electrones. Este vector suma tendrá una orientación y en función de la disposición cristalina del material, el resto de átomos vecinos tendrán la misma orientación u otra aleatoria, pudiendo anularse o no el efecto magnético en el material.

Los electrones van a poseer un momento magnético intrínseco m debido a sus spines, perpendicular al movimiento orbital del electrón, que va a generar un flujo magnético B (ver Esquema 1.8).



Esquema 1.8. Representación de: a) el movimiento del electrón y su campo magnético I asociado; b) esquema considerando un área A de espesor l , donde se anulan los campos individuales quedando un campo Im total

En una matriz cristalina vamos a tener muchos electrones girando alrededor de muchos átomos en distintos planos y con spines orientados de forma aleatoria. El momento magnético de un material se descubre por el vector magnetización M cuya magnitud es igual al momento magnético (m_i) por unidad de volumen de la muestra ΔV . Teniendo en cuenta que en un volumen V vamos a tener N átomos, el momento magnético total M va a ser la suma individual de los momentos magnéticos m de los electrones; es lo que se conoce como Magnetización y se puede definir como:

$$M = \lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta V} \sum_{i=1}^N m_i = \frac{Im A}{\Delta V} = \frac{Im A}{Al} = \frac{Im}{l} \quad [1.10]$$

La orientación aleatoria de los momentos dipolares produce un vector suma igual a cero y por tanto nula magnetización, en la mayoría de los materiales. En cambio, si los momentos dipolares se alinean en determinadas direcciones del espacio, se obtendrá una magnetización que contribuirá a la inducción magnética B.

En presencia de un campo B_0 existen dos contribuciones a la inducción magnética: una dada por la corriente real debido a B_0 y la otra a partir de la magnetización asociada a los dipolos orientados en el material $\mu_0 M$. La inducción magnética total:

$$B = B_0 + \mu_0 M \quad [1.11]$$

donde M y B_0 no necesariamente tienen el mismo sentido. Si el material es paramagnético o ferromagnético, M tiene el mismo sentido que B_0 y B aumenta en el material. Para materiales diamagnéticos $B < B_0$ puesto que M es opuesto a B_0 .

El vector H, intensidad de campo magnético, se define como:

$$H = \frac{B}{\mu_0} - M \quad [1.12]$$

de donde obtenemos

$$B = \mu_0 H + \mu_0 M = \mu_0 (H + M) \quad [1.13]$$

donde el producto $\mu_0 M$ es la *polarización magnética* y μ_0 es la *permeabilidad en el vacío*.

En gran cantidad de materiales paramagnéticos y diamagnéticos isotrópicos la magnetización es proporcional a la intensidad de campo magnético:

$$M = \chi_m H \quad [1.14]$$

donde χ_m es una constante sin dimensiones llamada *susceptibilidad magnética*, que es positiva para paramagnéticos y negativa para diamagnéticos. Esta relación lineal no se aplica a materiales ferromagnéticos.

Sustituyendo en [1.13],
$$B = \mu_0(H + \chi_m H) = \mu_0(1 + \chi_m)H \quad [1.15]$$

como $B = \mu H$ siendo μ la *permeabilidad total*,

$$\mu_0(1 + \chi_m)H = \mu H \quad [1.16]$$

y entonces
$$\mu = \mu_0(1 + \chi_m) \quad [1.17]$$

La cantidad $1 + \chi_m$ es lo que se conoce como *permeabilidad relativa* μ_r del material y nos da el ratio entre la permeabilidad μ del material y la permeabilidad del espacio vacío μ_0 :

$$\mu = \mu_0 \mu_r \quad [1.18]$$

La permeabilidad relativa nos indica cuán grande o pequeña es la permeabilidad en relación con la permeabilidad del espacio vacío.

En función del tamaño del material se puede tener desde un imán, hasta una nanopartícula con un solo dominio magnético. Según se disminuye en tamaño, el número de dominios magnéticos desciende, pudiendo cambiar las propiedades magnéticas del material^{4,69,70,71}. Un campo magnético externo influirá en los materiales de distinta manera, por lo que hay que distinguir los tipos principales de materiales magnéticos que hay. Los materiales magnéticos pueden clasificarse por la forma de comparar μ con μ_0 como:

Diamagnético	$\mu < \mu_0$
Paramagnético	$\mu > \mu_0$
Ferromagnético	$\mu \gg \mu_0$

Diamagnéticos: son materiales que no poseen magnetismo de forma intrínseca ya que la disposición de los momentos sus electrones es tal que se produce una anulación del efecto magnético. Por medio de un campo magnético externo, este magnetismo se pone de manifiesto. El campo magnético externo genera magnetismo en el material, y además este material se va a oponer al campo que lo ha generado. Una vez se retira el campo magnético externo, estos materiales vuelven a su estado normal.

Ferromagnéticos: poseen magnetismo de forma intrínseca, sus momentos y dominios magnéticos están ordenados al azar. Al aplicarles un campo magnético externo, responderán al mismo, los dominios orientarán sus momentos magnéticos siguiendo la dirección del campo externo. Cuando se retira el campo magnético externo, permanecen magnetizados al interaccionar unos dominios con otros.

Paramagnéticos: estos materiales tienen sus momentos magnéticos ordenados al azar, sin dominios. Al aplicarles un campo magnético externo, estos momentos se alinean, pero interaccionan entre sí una vez el campo magnético se retira, permaneciendo magnetizados hasta que las interacciones desaparecen.

Superparamagnetismo: es un fenómeno que presentan los materiales ferromagnéticos cuando al disminuir su tamaño, su número de dominios magnéticos se reduce hasta que, en escalas nanométricas, se considera que queda un único dominio magnético por partícula. En ausencia de un campo magnético externo, el momento

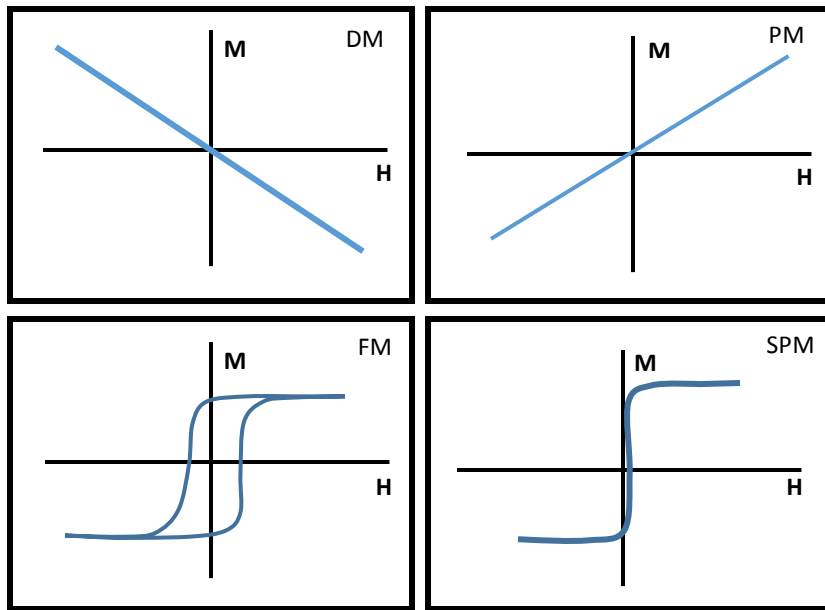
magnético del sistema que contiene las nanopartículas se encuentra anulado. Sin embargo, cuando se aplica un campo magnético externo, los momentos magnéticos se alinean, de forma parecida al comportamiento paramagnético, con la diferencia de que al retirar el campo magnético externo, estas partículas no permanecen magnetizadas y regresan a su estado basal de momento magnético anulado. Este comportamiento magnético es el que suelen mostrar las nanopartículas magnéticas. Además, la energía térmica puede ser suficiente para cambiar espontáneamente la magnetización dentro de cada nanopartícula magnética. Como resultado, en ausencia de un campo magnético externo, el momento magnético del sistema tiende a cero. El superparamagnetismo está basado en la ley física de activación para el tiempo de relajación τ :

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad [1.19]$$

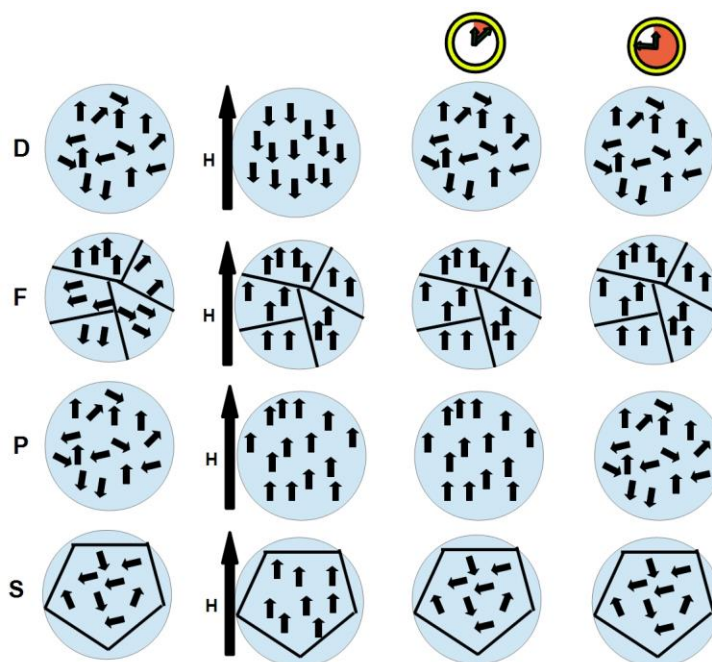
donde ΔE expresa la barrera de energía para el cambio de momento y $k_B T$ representa la energía térmica. El factor τ_0 es ligeramente temperatura dependiente cuando las partículas no interaccionan y toma el valor de 10^{-10} - 10^{-12} s. La energía de activación ΔE es proporcional al volumen V de la partícula y por esta razón el superparamagnetismo sólo es posible para partículas pequeñas para las que $\Delta E \approx k_B T$ a temperatura ambiente. No obstante, es significativo que el superparamagnetismo no solo depende de la temperatura, también depende del tiempo de medida (τ_m). Cuando $\tau \ll \tau_m$ el giro es rápido comparado con la ventana de tiempo experimental y las partículas parecen ser paramagnéticas, mientras que si $\tau \gg \tau_m$ el giro es lento y podemos observar propiedades cuasiestáticas (considerándose un estado bloqueado del sistema). La definición de temperatura de bloqueo (T_B) es el punto entre estas dos fases antes descritas y se va a

caracterizar por la condición de que $\tau = \tau_m$. Cuando la temperatura (T) es mucho menor que la temperatura de bloqueo T_B , $\tau \gg \tau_m$ y los momentos están cuasistáticos. En ausencia de un campo magnético externo y cuando la temperatura es superior a T_B , $\tau \ll \tau_m$, y el momento en el tiempo promedio en las partículas es igual a cero.

El Esquema 1.10 representa el comportamiento de los distintos materiales anteriormente descritos en reposo, en presencia de un campo magnético externo y tras retirarlo. En las medidas de magnetización de los materiales, se representa la magnetización frente al campo magnético a temperatura ambiente y según el material magnético, se va a obtener un ciclo de comportamiento distinto como se muestra en el Esquema 1.9.



Esquema 1.9. Respuesta magnéticas características de los distintos materiales, DM diamagnéticos, PM paramagnéticos, FM ferromagnéticos, SPM superparamagnéticos.



Esquema 1.10. Representación esquemática de un material diamagnético (D), ferromagnético (F) (los segmentos representan la separación de dominios), paramagnético (P) y superparamagnético (S) (el pentágono representa un único dominio); en estado basal, al aplicar un campo externo H; tras retirar el campo magnético y al cabo del tiempo.

Las nanopartículas magnéticas, debido a esta característica de verse afectadas bajo un campo magnético externo, pueden ser útiles para su uso como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI)⁴.

Agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen

Como “contraste” se entiende a diferencias en la señal entre regiones adyacentes como podrían ser tejido-tejido, tejido-vasos, tejido-hueso. En RMI el contraste ocurre como resultado de interacciones entre los agentes de contraste y los protones del agua circundante, que puede verse afectado por factores como la densidad de protones y las secuencias de pulso de RMI. La RMI está basada en la resonancia

magnética nuclear junto con la existencia de pequeños momentos magnéticos en los protones. Las células y tejidos tienen una ingente cantidad de protones, por ello la respuesta macroscópica de los tejidos bajo la acción de un campo magnético puede ser medida. Cuando el núcleo de los protones se expone a un campo magnético fuerte, sus espines atómicos se alinean de forma paralela y antiparalela al campo magnético. Durante el alineamiento, los espines preceden (entendiendo precesión como un giro lento del eje de un cuerpo rotante, como si fuera a trazar un cono) bajo una frecuencia específica conocida como frecuencia de Larmor. Cuando se introduce en el núcleo una frecuencia resonante de radiofrecuencia, los protones absorben energía y se excitan a un estado antiparalelo. Tras la desaparición del pulso de radiofrecuencia, los núcleos excitados se relajan a su estado inicial de baja energía. Hay dos tipos de relajación: i) relajación T1 o longitudinal, controlado por el spin del entorno y ii) relajación T2 o transversa, asociada con la pérdida de fase de los espines en el plano perpendicular a la orientación del campo magnético aplicado. En función del proceso de relajación los agentes de contraste se clasifican en agentes T1 o T2, siendo los agentes de contraste T1 complejos paramagnéticos y los T2 agentes basados en nanopartículas de óxido de hierro. El tiempo de relajación T2 es mayor cuando el contenido en agua es grande, por lo que tejidos que contengan grandes cantidades de agua serán más brillantes en las imágenes.

Las interacciones spin-spin entre los núcleos de hidrógeno o los electrones dan lugar a una pérdida de coherencia transversa que provoca la relajación T2 en los tejidos. Por ejemplo, la interacción de los protones de las macromoléculas en los tejidos puede inducir un campo magnético local además de un cambio en el campo magnético en su

entorno. Además, los gradientes de campo magnético locales pueden inducirse por diferencias en la susceptibilidad magnética entre los tejidos adyacentes o los agentes de contraste. Por ello, la relajación transversa se afecta por inhomogeneidades del campo magnético producidas por factores inherentes al tejido o por fuentes externas. Este es el tiempo de relajación total T_2^* y se describe como:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma B_s \quad [1.20]$$

donde γB_s representa la relajación por las inhomogeneidades del campo y se llama *efecto de susceptibilidad*. Las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas, cuando se les aplica un campo magnético externo, muestran una fuerte magnetización que puede provocar inhomogeneidades del campo microscópicas y activar el desfase de protones. Por lo tanto, las nanopartículas de óxido de hierro reducen los tiempos de relajación T_2 y T_2^* de las regiones vecinas y producen un descenso en la intensidad de señal en las imágenes de resonancia magnética T_2 y T_2^* pesadas⁷².

La capacidad de los agentes de contraste para alterar la relajación de los protones se denomina *relaxividad* y está relacionada con los tiempos de relajación y la concentración. Va a ser indicador de la efectividad del agente de contraste. Se relaciona de la siguiente forma:

$$\frac{1}{T_x} = \frac{1}{T_{x0}} + R_x C \quad [1.21]$$

donde R es la relaxividad en $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$, C la concentración del agente de contraste y $x = 1, 2 \text{ o } 2^*$.

Hipertermia

Este fenómeno incluye la dispersión de nanopartículas magnéticas por la zona o tejido de interés y seguidamente aplicar un campo magnético externo con fuerza y frecuencia de alternancia suficiente para provocar un aumento de temperatura de las partículas, pudiendo alcanzarse temperaturas de 44 °C⁶⁷, suficiente para producir la muerte celular en tejidos tumorales. La dificultad principal de esta técnica reside en alcanzar el tejido diana por las nanopartículas magnéticas y en cantidad suficiente para la generación de calor, además del empleo de un campo magnético alterno en condiciones aceptadas clínicamente. Hay ya estudios en los que se emplea hipertermia con éxito⁷³ estando aceptada por la FDA sólo o en combinación con radiación en casos de algunos tumores sólidos malignos.

Las frecuencias (f) utilizadas normalmente son de 0.05 y 1.2 MHz y las amplitudes empleadas se encuentran en el rango de $H = 0 - 15 \text{ kAm}^{-1}$. Cuando $H \cdot f$ no es mayor de $4.85 \times 10^8 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ se ha demostrado que el campo no es dañino⁷⁴. La cantidad de calor producido por unidad de volumen es el área del ciclo de histéresis M-H multiplicado por la frecuencia:

$$P = \mu_0 f \oint H dM \quad [1.22]$$

donde f es la frecuencia, μ_0 la permeabilidad en el vacío, H la fuerza del campo magnético y M la magnetización. Normalmente las medidas de producción de calor de las nanopartículas magnéticas se estiman en términos de ratio de absorción específica, expresado en Wg^{-1} . El producto de la densidad de partículas por el ratio de absorción específica da P , lo que permite comparar la eficacia de las distintas nanopartículas

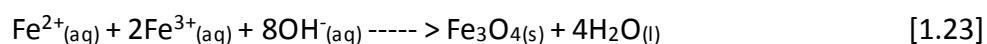
magnéticas. Las nanopartículas superparamagnéticas tienen la capacidad de producir grandes cantidades de calor a campos bajos ($< 15 \text{ kAm}^{-1}$). Por ejemplo, uno de los valores de ratio de absorción específica para fluidos superparamagnéticos es de 45 Wg^{-1} a 300 kHz y 6.5 kAm^{-1} (209 Wg^{-1} para 14 kAm^{-1})⁷⁵.

1.2-4. Síntesis de nanopartículas magnéticas

Se pueden usar numerosos métodos para sintetizar nanopartículas magnéticas de pocos nanómetros y relativa monodispersidad, entre los que destacan microemulsiones, síntesis sol-gel, reacciones sonoquímicas, reacciones hidrotérmicas, hidrólisis y termólisis de precursores, síntesis por flujo de inyección y síntesis electrospray⁴. Las síntesis por coprecipitación y descomposición térmica van a proporcionar buenos resultados y son síntesis con buenos rendimientos.

Síntesis por coprecipitación

Uno de los métodos más comunes en la preparación de partículas de Fe_3O_4 es el desarrollado por Massart⁷⁶. Se usan sales de cloruro de hierro (como FeCl_3 y FeCl_2) mediante una mezcla estequiométrica 2:1 en un medio acuoso con pH elevado. La reacción química de formación de Fe_3O_4 se puede describir como:



De acuerdo con la termodinámica de esta reacción, debería esperarse una precipitación de Fe_3O_4 completa con un pH entre 8 y 14, con un ratio estequiométrico

2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). Sin embargo, la magnetita (Fe_3O_4) no es muy estable y es sensible a la oxidación convirtiéndose en maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en presencia de oxígeno al cabo del tiempo. Se obtienen así partículas de un tamaño de 8 nm, pero es posible obtener partículas de tamaños mayores a través del control de la temperatura, del pH y de los ratios de las sales.

La principal ventaja del proceso de coprecipitación es que se pueden sintetizar una gran cantidad de nanopartículas con un rendimiento elevado. Sin embargo, el control de la distribución de tamaños de las partículas es limitado, porque los factores cinéticos que controlan el crecimiento del cristal dependen del pH y la temperatura. En la coprecipitación están involucradas dos fases: una fase de nucleación que ocurre cuando la concentración de las especies alcanza una concentración crítica, y luego una fase de crecimiento de los núcleos por difusión de los solutos a la superficie del núcleo del cristal. En el diagrama de la Figura 1.1 se muestra la formación de micro y nanopartículas monodispersas con los mecanismos de nucleación y crecimiento.

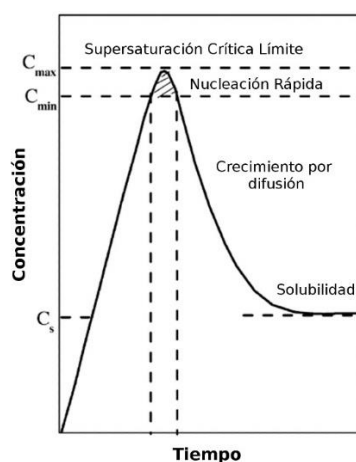
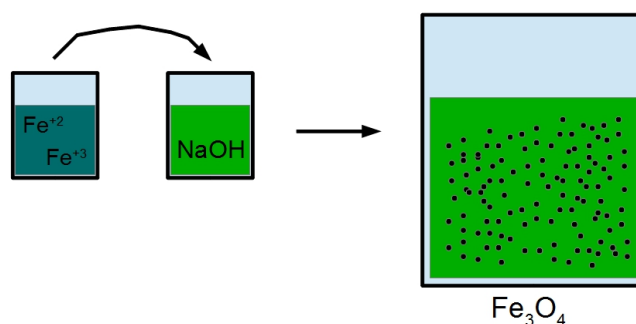


Figura 1.1. Diagrama de nucleación de LaMer

Para poder obtener una solución monodispersa de partículas, la situación más favorable se da cuando se obtiene una etapa de nucleación rápida separada de la siguiente fase, la de crecimiento. Un factor importante para controlar el tamaño es el control de la variación de la temperatura; así por ejemplo, temperaturas altas conducen a la formación de menos núcleos de crecimiento y por ello, a partículas de mayor tamaño. En el Esquema 1.11 se resume el método de obtención de nanopartículas por coprecipitación.

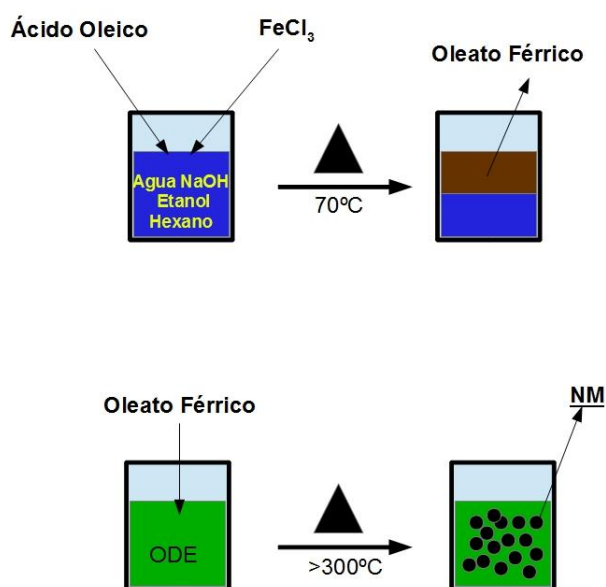


Esquema 1.11. Esquema simplificado del método de coprecipitación.

Síntesis por descomposición térmica

En este tipo de síntesis de nanopartículas magnéticas se van a conseguir tamaños pequeños y una buena monodispersidad con el control de la temperatura. La base del proceso es la descomposición a alta temperatura de precursores orgánicos de hierro como $\text{Fe}(\text{Cup})_3$, $\text{Fe}(\text{CO})_5$, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, $\text{Fe}(\text{oleato})_3$, usando solventes orgánicos y surfactantes. Estos procesos permiten obtener partículas de tamaño de 4 a 16 nm⁷⁷. El tamaño se puede controlar regulando también la concentración y ratios de los reactivos,

naturaleza de los solventes, precursores y fuerza de complejación. En este proceso, las sales de hierro se preparan previamente uniéndolas a un compuesto orgánico y mediante temperaturas muy elevadas, se produce la descomposición de este compuesto a la vez que se cambia el estado de oxidación de la nanopartícula, consiguiendo finalmente nanopartículas de hierro recubiertas con una fina capa del compuesto orgánico del que se partió, obteniendo así buena monodispersidad y estabilidad coloidal. El Esquema 1.12 resume el método en dos pasos para la obtención de nanopartículas magnéticas.



Esquema 1.12. Esquema de síntesis en dos pasos de nanopartículas magnéticas por descomposición térmica por el método de Hyeon⁶¹

1.3- MATERIALES HÍBRIDOS

1.3-1. Introducción

Los materiales híbridos son sistemas formados por una parte inorgánica, como pueden ser partículas de óxido de hierro, en combinación con una parte orgánica, como pueden ser polímeros. El fin que se quiera dar a estos materiales es el que determina qué tipo de sistema híbrido realizar. Nuestra idea es aunar en un solo sistema la capacidad de transporte de un principio activo, la localización del mismo y el tratamiento final en el tejido deseado.

Una de las maneras de crear sistemas híbridos consiste en la modificación en superficie de partículas de óxido de hierro o sílice con polímeros o copolímeros. Esta modificación además les dará estabilidad coloidal a las partículas. La funcionalización en superficie puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: una de ellas se la denomina “injerto desde” que consiste en generar el crecimiento del polímero desde la nanopartícula, bien directamente desde la misma, bien utilizando un agente de unión previamente anclado en la superficie. Esta técnica tiene la ventaja de obtener muchos puntos de unión, con lo que la densidad de recubrimiento de las partículas será la mayor posible; en cambio, tiene la desventaja de que el tamaño del polímero crecido en su superficie va a ser difícil de controlar. La otra técnica se la denomina “injerto hacia” en la cual el proceso es al revés, la cadena del polímero o copolímeros ya está generada previamente y se produce su unión a la nanopartícula por uno de los extremos (o con el nexo de unión del copolímero si éste lo tiene). La ventaja de esta técnica reside en que el tamaño de los polímeros a anclar es conocido al haberse controlado su síntesis previamente o haberse adquirido comercialmente; la principal desventaja está en que

habrá menos puntos de unión y por tanto menos densidad de recubrimiento, ya que los propios polímeros por impedimentos estéricos provocarán que la unión a las partículas no sea en zonas muy cercanas.

1.3-2. Propiedades

Los sistemas híbridos van a poseer las propiedades de los materiales que los componen. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas podrán dotar al sistema híbrido de una respuesta a campos magnéticos externos, de capacidad de ser detectados por técnicas de imagen y generar hipertermia, tanto para el tratamiento en sí mismo aumentando la temperatura local provocando la muerte celular como para la liberación de principios activos al transferir el calor a los polímeros que la funcionalicen. Esto último es posible si se utilizan polímeros de bajo punto de fusión como es la policaprolactona. Así, se puede crear un sistema híbrido de nanopartículas magnéticas con policaprolactona el cual puede ser cargado con un principio activo de naturaleza lipófila, como pueden ser los antitumorales y posteriormente liberarlo mediante hipertermia. Otra posibilidad interesante es la de utilizar un copolímero formado por polímeros con distinta miscibilidad de manera que se dotaría al sistema de carácter anfifílico. Los sistemas híbridos nanométricos han empezado a recibir el nombre de teranósticos^{19,20,78,79}, ver Figura 1.2.

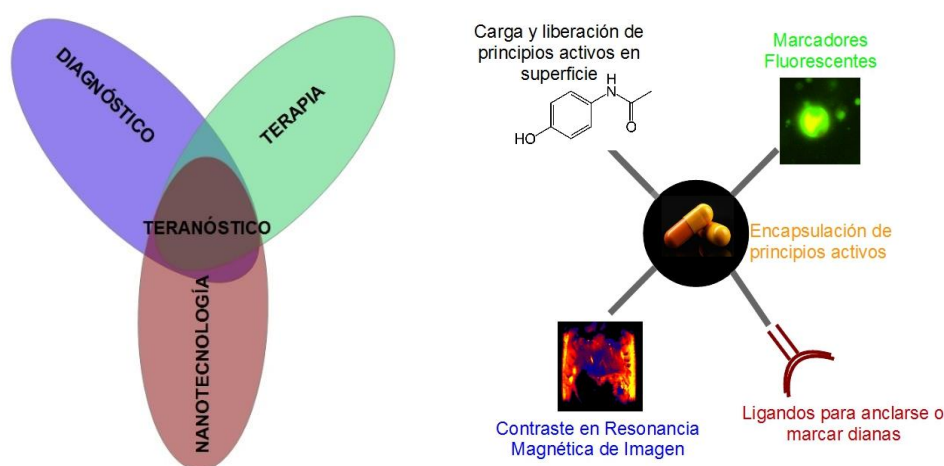


Figura 1.2. Confluencia de las distintas aplicaciones que dan lugar a un sistema teranóstico y esquema de varias posibilidades de aplicación.

Los teranósticos son materiales que combinan terapia y diagnóstico de imagen con la nanotecnología. Así, los teranósticos son capaces de transportar principios activos y agentes de diagnóstico de imagen, todo a la vez, por lo que potencialmente subsanan las diferencias indeseables en biodistribución y selectividad que actualmente existen entre los distintos agentes terapéuticos y de contraste. El objetivo último en el campo de los teranósticos es tener la habilidad de monitorizar por imagen el tejido dañado o enfermo y ganar en eficacia de liberación de principios activos con la esperanza de poder ajustar la dosis terapéutica hasta el punto de poder hacerla personalizada⁸⁰. El aspecto más prometedor de utilizar sistemas híbridos nanométricos como teranósticos, es su potencial para localizar o marcar de algún modo específico el lugar de la enfermedad y reducir o eliminar los efectos adversos de los principios activos. El sistema híbrido debe evitar que los principios activos sean aclarados por los riñones aumentando el tiempo en el que permanecen en torrente sanguíneo, ya que dependiendo de la funcionalización del mismo se puede evitar el sistema retículo endotelial. Además, los

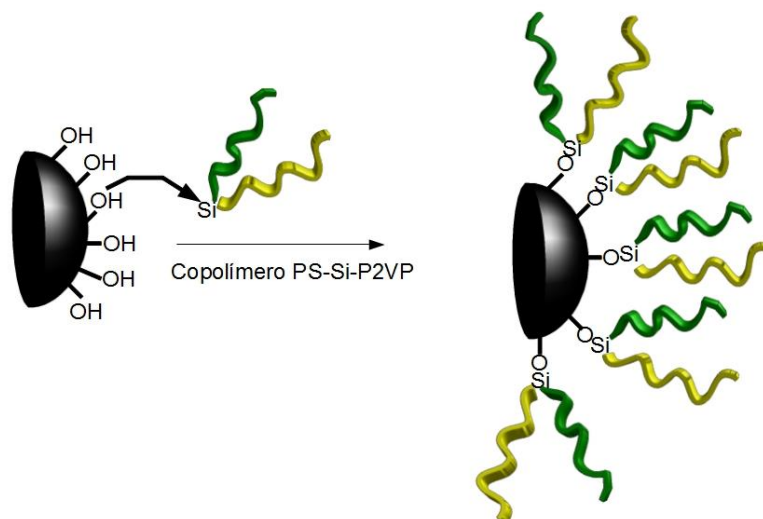
vasos sanguíneos en numerosos tipos de tumores, tienen formas irregulares, están dilatados, debilitados, y pueden presentar fenestraciones. Las partículas nanométricas pueden extravasarse así del torrente sanguíneo a tejido tumoral y ser retenidos allí gracias al pobre drenaje linfático de la zona. Este fenómeno de retención selectiva de nanosistemas híbridos en tejidos tumorales se denomina *efecto de retención y permeabilidad mejorado* (EPR por sus siglas en inglés de enhanced permeability and retention)^{81,82}. Hay que sumar el elevado área de superficie que las nanopartículas tienen, por lo que se aumenta el rendimiento cargando principios activos y teniendo agentes de contraste, además de que se pueden recubrir con agentes enmascarantes a macrófagos como polietilenglicol, se incrementa el contraste en técnicas de imagen y se mejora la concentración local del principio activo en la zona de interés disminuyendo su toxicidad.

1.3-3. Síntesis de materiales híbridos para esta tesis

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un copolímero dibloque de poliestireno y poli(2-vinilpiridina) usando el método “injerto hacia”.

Este sistema híbrido consiste en un núcleo de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con una cubierta de un copolímero dibloque de poliestireno (PS) y poli(2-vinilpiridina) (P2VP), los cuales están unidos por un puente silano. La síntesis se ha realizado mediante el método de “injerto hacia”. En la superficie de las nanopartículas magnéticas tenemos grupos hidroxilo, estos grupos OH reaccionarán con el puente silano provocando una unión covalente del copolímero en la superficie de las

nanopartículas magnéticas obteniendo así un sistema híbrido anfifílico con propiedades surfactantes, tal como se indica en el Esquema 1.12.

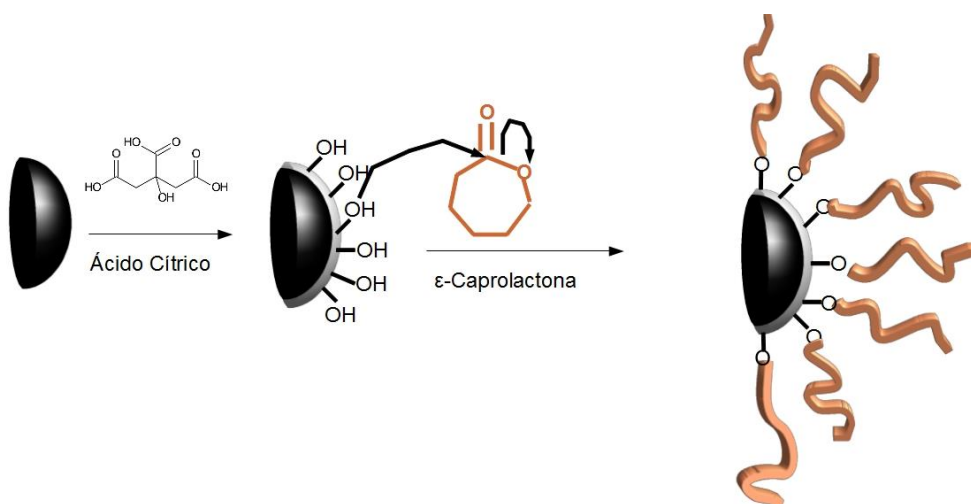


Esquema 1.12. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con el copolímero anfifílico de PS y P2VP con puente de silicio

El copolímero estará anclado a nanopartículas obtenidas mediante el método de Massart, que ofrecen una buena respuesta magnética. El PS y la P2VP son polímeros no biodegradables, sin embargo sus propiedades surfactantes podrían aprovecharse para realizar emulsiones magnéticas. Las nanopartículas magnéticas de este sistema híbrido se situarán en la interfaz de la emulsión y, gracias a su buena respuesta magnética, podrán permitir que las gotículas de la emulsión puedan ser dirigidas mediante un campo magnético externo pudiendo servir como forma de purificación de fluidos o de extracción de sustancias de un medio.

Síntesis de un sistema híbrido de policaprolactona con nanopartículas magnéticas vía “injerto desde”

La síntesis de policaprolactona se puede llevar a cabo mediante la reacción de apertura de anillo iniciada por los grupos hidroxilo que hay en la superficie de las nanopartículas magnéticas. Para mejorar la reactividad de la superficie de las nanopartículas, éstas se recubren con ácido cítrico el cual les proveerá de un mayor número de grupos hidroxilo. El grupo OH se une al anillo lactónico de la ϵ -caprolactona provocando su apertura y una terminación en alcóxido terminal, que propagará la reacción. Ver Esquema 1.13.

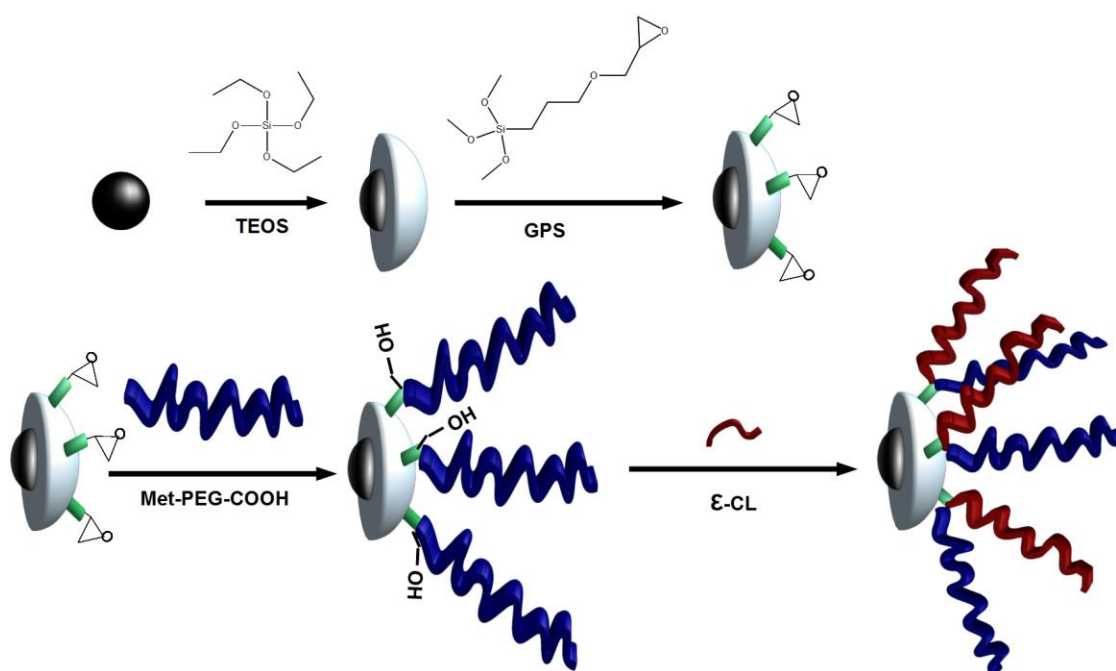


Esquema 1.13. Polimerización de la ϵ -caprolactona en la superficie de las nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas obtenidas por el método de coprecipitación de Massart, tienen una superficie con grupos hidroxilo suficientes para iniciar la polimerización de la ϵ -caprolactona. Además, al tener buena respuesta magnética, serán útiles para su empleo en hipertermia, característica deseada para fundir la policaprolactona.

Nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice y funcionalizadas con un copolímero dibloque de metoxi-polietilenglicol (met-PEG) y policaprolactona (PCL)

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de un sistema híbrido compuesto por un único núcleo inorgánico de nanopartículas de hierro, cuya estabilidad coloidal fue mejorada gracias a un recubrimiento de sílice. A su vez, la sílice se funcionalizó con un compuesto con un grupo epoxi con el fin de poder anclar dos polímeros vía “injerto hacia” e “injerto desde” con distinta miscibilidad y biocompatibles, de manera que se obtuviesen sistemas híbridos de nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice y funcionalizadas con “pelos” anfifílicos de dos polímeros, uno hidrofílico y otro hidrofóbico, como son el met-PEG y la PCL. Ver Esquema 1.14.



Esquema 1.14. Representación de la síntesis de nanopartículas magnéticas con cubierta de sílice funcionalizadas con met-PEG y PCL

Las nanopartículas magnéticas que forman parte del núcleo del sistema fueron obtenidas mediante el método de Hyeon. Esto permite obtener un sistema híbrido con una sola partícula central, que tiene una menor respuesta magnética que las obtenidas por el método de Massart, pero lo suficiente como para responder a campos magnéticos y por ello ser útiles en resonancia magnética de imagen.

1.4- OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de tesis han sido:

- La síntesis y la caracterización de nuevos biomateriales híbridos sensibles a estímulos externos para aplicaciones en liberación de principios activos.
- El control de la liberación de principios activos encapsulados en materiales híbridos a través de hipertermia.
- El desarrollo de un sistema polimérico con comportamiento UCST y su caracterización.

1.5- REFERENCIAS DE LA INTRODUCCIÓN

- 1- Veiseth O., Gunn J.W., Zhang M.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, Issue 3, 2010, 284–304
- 2- Ward M.A., Georgiou T.K.; *Polymers* 2011, 3, 1215-1242
- 3- Rajib Ghosh Chaudhuri, Santanu Paria; *Chem. Rev.* 2012, 112, 2373–2433
- 4- Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, Robert N. Muller; *Chem. Rev.*; 2008, 108, 2064–2110
- 5- Paolo Fortina, Larry J Kricka, David J Graves, Jason Park, Terry Hyslop, Felicia Tam, Naomi Halas, Saul Surrey, Scott A Waldman; *Trends in Biotechnology*; 2007; 25(4); 145-52
- 6- Chertok B, David AE, Yang VC.; *J Control Release*; 2011; 155(3); 393-9
- 7- Rui Hao , Ruijun Xing , Zhichuan Xu , Yanglong Hou, Song Gao , Shouheng Sun; *Adv. Mater*; 2010, 22, 2729–2742
- 8- XiaWei Wei, ChangYang Gong, MaLing Gou, ShaoZhi Fu, QingFa Guo, Shuai Shi, Feng Luo, Gang Guo, LiYan Qiu, ZhiYong Qian ; *International Journal of Pharmaceutics*; 2009; 381; 1–18
- 9- Zhang, J.; Misra, R.D.K ; *Acta Biomaterialia*; vol. 3, issue 6; 2007; 838-850
- 10- S. Chawla, Mansoor M. Amiji ; *International Journal of Pharmaceutics*; 2002; 249; 127-138
- 11- Dinesh B. Shenoy, Mansoor M. Amiji; *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 293; 261–270
- 12- Chan A, Orme RP, Fricker RA, Roach P.; *Adv Drug Deliv Rev.*; 2013 Apr; 65(4):497-514
- 13- Sneha S. Kelkar; Theresa M. Reineke; *Bioconjugate Chem.*; 2011, 22, 1879–1903
- 14- Rizia Bardhan, Surbhi Lal, Amit Joshi, Naomi J. Halas; *Accounts of chemical research*, 2011; vol 44; nº 10; 936–946
- 15- Twan Lammers, Silvio Aime , Wim E. Hennink, Gert Storm, Fabian Kiessling; *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44 (10), 1029–1038
- 17- Mura S, Couvreur P., Mary E. Caldorera-Moore, William B. Liechty, Nicholas A. Peppas; *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44 (10), 1061–1070
- 18- Mura S, Couvreur P.; *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Oct; 64(13):1394-416
- 19- Jin Xie, Seulki Lee, Xiaoyuan Chen; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62, 1064–1079
- 20- Siti M. Janib, Ara S. Moses, J. Andrew MacKay; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 2010, 62, 1052–1063
- 21- Fundamentals of Polymer Engineering, Rakesh K. Gupta, 2003 Marcel Dekker, Inc., New York.

- 22- Rubio-Retama J., Zafeiropoulos N.E., Serafinelli C., Rojas-Reyna R., Voit B., Lopez-Cabarcos E., Stamm M.; *Langmuir*, 2007, 23, 10280-10285
- 23- Dirk Schmaljohann, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58, 1655–1670
- 24- Mark A. Ward; Theoni K. Georgiou; *Polymers*; 2011, 3, 1215-1242
- 25- Ghulam Hussain , Amy Robinson , and Paul Bartlett; *Langmuir*, 2013, 29 (13), 4204–4213
- 26- Serrano-Ruiz D, Laurenti M, Ruiz-Cabello J, López-Cabarcos E, Rubio-Retama J.; *J Biomed Mater Res Part B*; 2013;101B;498–505.
- 27- Toribio F. Otero, Jose G. Martinez; *Chem. Mater.*, 2012, 24 (21), pp 4093–4099
- 28- Matthias Karg, Yan Lu, Enrique Carbó-Argibay, Isabel Pastoriza-Santos, Jorge Pérez-Juste, Luis M. Liz-Marzán; Thomas Hellweg; *Langmuir*, 2009, 25 (5), pp 3163–3167
- 29- Principles of Polymer Chemistry; Paul J. Flory; Cornell University Press, Ithaca, New York, 1953
- 30- T. Tanaka; *Phys. Rev. Letter.*; 1978, 12, 820
- 31- Marco Laurenti, Pablo Guardia, Rafael Contreras-Caceres, Jorge Perez-Juste, Antonio Fernandez-Barbero, Enrique Lopez-Cabarcos, Jorge Rubio-Retama; *Langmuir*, 2011, 27, 10484–10491
- 32- C. Daubresse, Ch. Grandfils, R. Jérôme, Ph. Teyssié.; *Colloid and polymer science*; 1996, vol 274, iss. 5, 482-489
- 33- Catherine Daubresse, Christian Grandfils, Robert Jerome, Philippe Teyssie ; *Journal or Colloid and Interface Science*, 1994, 168, 222-229
- 34- Georges Staikos, Georges Bokias, Katerina Karayanni, *Polymer International*, 1996, 41, 345-350
- 35- Colmenero J.; Arbe A. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2013 , 51, 87.
- 36- Arbe A.; Alegría A.; Colmenero J. *Macromolecules* 1999 32, 7572.
- 37- Pérez R.; Arbe A.; Colmenero J.; Frick B.; Willner L.; Richter D.; Fetters L.J. *Macromolecules* 2006 , 39, 1060.
- 38- Bee, M.; Hilger, A. *Quasielastic Neutron Scattering*; IOP: Bristol, 1988.
- 39- López-Cabarcos, E.; Batallan, F.; Frick, B.; Ezquerra, T.; Baltá-Calleja, F.J. *Phys. Rev. B* 1994, 50, 13214.
- 40- Ryong-Joon, R. *Methods of X-ray and Neutron Scattering in Polymer Science*; Oxford University Press, Inc.: New York, 2000.
- 41- Principles of Polymer Chemistry; Ravve, A.; 2000, Springer, Springer Science+Business Media New York
- 42- Tapan K. Dñash, V. Badireenath Konkimalla; *Mol. Pharmaceutics*; 2012, 9, 2365–2379

- 43- Marianne Labet, Wim Thielemans; *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 3484–3504
- 44- J. Yang, S.-B. Park, Ho-Geun Yoon, Y.-M. Huh, S. Haam; *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 324, 185–190
- 45- Courtney R. Reed, Li Han, Anthony Andrady, Montserrat Caballero, Megan C. Jack, James B. Collins, Salim C. Saba, Elizabeth G. Lobo, Bruce A. Cairns, John A. van Aalst ; *Annals of Plastic Surgery*, Vol.62, № 5, 2009
- 46- Ebersole GC, Buettmann EG, MacEwan MR, Tang ME, Frisella MM, Matthews BD, Deeken CR; *Surg Endosc.*; 2012;26(10); 2717-28
- 47- Tsung-Hua Yang; *Recent Patents on Materials Science*; 2008, 1, 29-40
- 48- Dai-Chao Cui, Wan-Liang Lu, Er-ASa, Meng-Jie Gu, Xiao-Jing Lu, Tian-Yuan Fan; *International Journal of Pharmaceutics*; 2012; 436; 527–535
- 49- Marguerite J. Kutyła, Lynette K. Lambert, Nigel M. Davies, Ross P. McGearry, P. Nicholas Shawa, Benjamin P. Ross ; *International Journal of Pharmaceutics*; 2013; 444; 175–184
- 50- Yunlu Dai, Cuimiao Zhanga, Ziyong Chenga, Ping'an Maa, Chunxia Li, Xiaojiao Kanga, Dongmei Yanga, Jun Lin ; *Biomaterials*; 2012; 33; 2583-2592
- 51- Laleh Solhi, Mohammad Atai, Azizollah Nodehi, Mohammad Imani, Azadeh Ghaemi, Kazem Khosravi ; *Dental Materials*, 2012, 28, 369-377
- 52- Stanisław Chibowski, Małgorzata Paszkiewicz; *Physicochemical Problems of Mineral Processing* 2006; 40; 175-184
- 53- Magdy Y. Abdelaal, Mohammad S.I. Makki, Tariq R.A. Sobahi ; *American Journal of Polymer Science*; 2012, 2(4); 73-78
- 54- Steevens N. S. Alconcel, Arnold S. Baa, Heather D. Maynard; *Polym. Chem.*, 2011, 2, 1442–1448
- 55- Hidenori Otsuka, Yukio Nagasaki, Kazunori Kataoka; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 2012; 64; 246–255
- 56- Jang JY, Lee DY, Park SJ, Byun Y.; *Biomaterials*. 2004; 25(17); 3663-9
- 57- Alisar S. Zahr, Cheryl A. Davis, Michael V. Pishko; *Langmuir*; 2006, 22, 8178-8185
- 58- Valeria Hidalgo-Ruz, Lars Gutow, Richard C. Thompson, Martin Thiel; *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46 (6), 3060–3075
- 59- Yi Xu, Linhua Jiang, Jinxia Xu, Yang Li; *Construction and Building Materials*; 2012; 27; 32–38
- 60- M. N. Gorsd, M. N. Blanco, L. R. Pizzio; *Procedia Materials Science* 1; 2012; 432 – 438

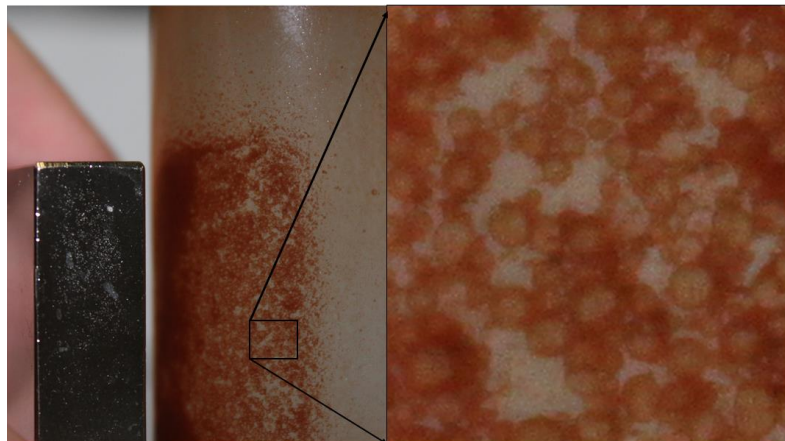
- 61- S. Fujii, S. Kameyama, S. P. Armes, D. Dupin, M. Suzakia, Y. Nakamura; *Soft Matter*, 2010, 6, 635-640
- 62- Peng Xu, Xin Ji, Hongmin Yang, Junlei Qi, Weitao Zheng, Volker Abetz, Shimei Jiang, Jiacong Shen; *Materials Chemistry and Physics*; 2010; 119; 249–253
- 63- Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, Robert N. Muller; *Chem. Rev.*; 2008, 108, 2064–2110
- 64- D.B. Janes, V.R. Kolagunta, R.G. Osifchin, J.D. Bielefeld, R.P. Andres, J.I. Henderson, C.P. Kubiak; *Superlattices and Microstructures*; 1995; Vol. 18, Issue 4, 275
- 65- Ting-Yu Liu, Shang-Hsiu Hu, Dean-Mo Liu; *Nano Today*; 2009, 4, 52—65
- 66- Dong Kee Yi, S. Tamil Selvan, Su Seong Lee, Georgia C. Papaefthymiou, Darshan Kundaliya, Jackie Y. Ying; *J. Am. Chem. Soc.*; 2005, 127, 4990-4991
- 67- Challa S. S. R. Kumar, Faruq Mohammad; *Adv Drug Deliv Rev.*; 2011; 63(9); 789–808
- 68- Yongkang Sun, Lei Duan, Zhirui Guo, Yun DuanMu, Ming Ma, Lina Xu, Yu Zhang, Ning Gu; *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*; 2005; 285; 65–70
- 69- S Banerjee, A.K. Tyagi; *Functional Materials: Preparation, Processing and Applications*; Elsevier; 2012; DOI:10.1016/B978-0-12-385142-0.00006-4
- 70- Dante Gatteschi, Lapo Bogani, Andrea Cornia, Matteo Mannini, Lorenzo Sorace, Roberta Sessoli *Solid State Sciences*; 2008; 10; 1701-1709
- 71- Magnetism and magnetotransport of magnetic nanoparticle arrays; Jang, Seongjin; State University of New York at Buffalo, ProQuest, UMI Dissertations Publishing, 2007.
- 72- Hyon Bin Na, In Chan Song, Taweghwan Hyeon; *Adv. Mater.* , 2009, 21, 2133
- 73- Xu-Hong Li, Peng-Fei Rong, He-Kun Jin, Wei Wang, Jin-Tian Tang; *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2012, 3, 279
- 74- Atkinson W.J., Brezovich I.A., Chakraborty D.P.; *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1984, BME-31, 1
- 75- Hergt R., Dutz S., Müller R., Zeisberger M.; *J. Phys.: Condens. Matter*, 2006, 18, S2919-S2934
- 76- René Massart; *IEEE Transactions on Magnetica*s, 1981, Vol. mag-17, 2
- 77- Jongnam Park, Kwangjin An, Yosun Hwang, Je-Geun Park, Han-Jin Noh, Jae-Young Kim, Jae-Hoon Park, Nong-Moon Hwang, Taeghwan Hyeon; *Nature Materials*; 2004; Vol. 3, 12, 891-5
- 78- Mary E. Caldorera-Moore, William B. Liechty, Nicholas A. Peppas; *Accounts of Chemical Research*, 2011, Vol. 44, No 10, 1061-1070

- 79- Sonke Svenson, *Mol. Pharmaceutics*, 2013, 10, 848–856
- 80- Warenius, H. M.; *Expert Opin. Med. Diagn.*; 2009, 3, 381–393
- 81- Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J., and Maeda, H.; *Drug Discovery Today*, 2006, 11, 812–818
- 82- Maeda, H., Greish, K., and Fang, J.; *Adv. Polym. Sci.*; 2006; 193, 103–121

RESULTADOS

CAPÍTULO 2

EMULSIONES MAGNÉTICAS



TDC 1. Emulsiones magnéticas basadas en materiales híbridos

2.- RESUMEN

“En este capítulo se muestra la forma de preparar surfactantes magnéticos combinando las propiedades de las nanopartículas de óxido de hierro con las propiedades de solvencia selectiva que aportan polímeros dibloque basados en poli(estireno)-b-poli(2-vinilpiridina). El resultado es un material híbrido capaz de formar emulsiones en las que las nanopartículas híbridas se disponen en la interfase de la emulsión, estabilizándola y permitiendo que responda a campos magnéticos”

2.1 - INTRODUCCIÓN

Los materiales inorgánicos cambian sus propiedades cuando su tamaño decrece hasta escalas nanométricas, este es el caso de los puntos cuánticos fluorescentes basados en semiconductores como el CdTe, PbS, los cuales ofrecen la posibilidad de ajustar su “band-gap”, lo que conlleva una modificación en su longitud de onda de emisión¹⁻⁴. Otro ejemplo característico son las nanopartículas de oro, que cambian la absorbancia de su plasmón de superficie desde la longitud de onda ultravioleta, en tamaño macroscópico, a la longitud de onda del visible en tamaños nanoscópicos⁵. En el caso de materiales magnéticos, la reducción del tamaño puede dar como resultado superparamagnetismo, el cual aparece cuando las nanopartículas están constituidas por monocristales magnéticos o monodominios magnéticos⁶. Las nanopartículas superparamagnéticas pueden guiarse por un campo magnético, y cuando éste desaparece, la magnetización de la nanopartícula también desaparece.

Una de las mayores ventajas de las nanopartículas es su elevada superficie específica, mientras que a su vez es su mayor desventaja, puesto que su falta de estabilidad conduce a su agregación y precipitación. Una forma común de prevenir la agregación es funcionalizando la superficie de la nanopartícula con surfactantes o polímeros que pueden estabilizar el sistema por impedimentos estéricos⁷⁻¹⁰. Por otro lado, las nanopartículas con su cubierta polimérica constituyen un sistema híbrido que mezcla las propiedades de ambos componentes. Así, es posible preparar nanopartículas con propiedades hidrofílicas y lipofílicas de forma simultánea usando copolímeros anfifílicos con un bloque hidrofílico y otro lipofílico. Lo más interesante es que estos copolímeros poseen propiedades surfactantes y pueden autoensamblarse formando micelas y estructuras líquido-cristalinas. La combinación de estas propiedades con las de las nanopartículas magnéticas podría conducir a surfactantes magnéticos que se pueden usar para preparar emulsiones reactivas a campos magnéticos externos. Estos materiales podrían encontrar aplicaciones en medicina y farmacología como transportadores de proteínas, ADN¹¹, péptidos, hormonas, agentes antitumorales¹²⁻¹⁴, como herramientas de diagnóstico de imagen¹⁴ y como biosensores¹⁵⁻¹⁷.

El objetivo del presente capítulo es la síntesis de nanopartículas magnéticas con propiedades surfactantes. Para ello, se ha unido covalentemente un copolímero dibloque anfifílico a la superficie de las nanopartículas con el fin de otorgarles miscibilidad tanto en medios acuosos como en solventes orgánicos, a la vez que le proporciona el impedimento estérico suficiente para estabilizar las nanopartículas y prevenir agregaciones. Se ha modificado la superficie de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de 10 nm de diámetro con un copolímero dibloque específico de poliestireno-SiCl₂-

poli(2vinilpiridina) (PS-*b*-P2VP) y se han utilizado para preparar una emulsión magnética usándolas como surfactantes.

2.2 – MATERIALES Y MÉTODOS

2.2-1 Materiales

Los precursores de cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) fueron obtenidos de Panreac. Los monómeros (estireno y 2-vinilpiridina), el iniciador (*sec*-BuLi), solvente de polimerización (THF anhidro) y el agente de unión (tetraclorosilano o SiCl_4) se purificaron de acuerdo a la literatura¹⁸. El ácido clorhídrico y el hidróxido sódico (Panreac) se obtuvieron con la máxima pureza y se usaron sin purificaciones posteriores. Se obtuvo un imán comercial de NdFeB con un campo magnético de 0.4 T de www.supermagnete.de.

2.2.2- Métodos

Métodos de caracterización

Las medidas de Rayos-X se llevaron a cabo usando un difractómetro Philips X'Pert PW3050. Los difractogramas se obtuvieron en modo de reflexión usando un intervalo 2θ entre 1.5° y 35° con un error estimado en las posiciones de reflexión de $\pm 0.2^\circ$ registrando a pasos de 0.01° por segundo. Se usó polvo de sílice para calibrar la distancia de la muestra al detector. La temperatura de las muestras se midió con una precisión de $\pm 3^\circ$.

El tamaño y morfología de las nanopartículas se midieron con un microscopio de electrones JEOL JEM-2100 trabajando a 200 KV. Se tomaron micrografías de las muestras

con una ampliación de x60K a x500K. Las gradillas de TEM se prepararon por la técnica de goteo.

Las medidas de infrarrojo se registraron usando un espectrómetro Nicolet IR200. Las muestras se analizaron usando tabletas de bromuro potásico enriquecido con nanopartículas entre un 2% y un 5%.

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se midió usando un sistema Malvern-NanoZS equipado con un láser He-Ne trabajando a 633 nm y un Peltier para controlar la temperatura.

Las medidas de ángulo de contacto se llevaron a cabo usando una videocámara conectada a un goniómetro.

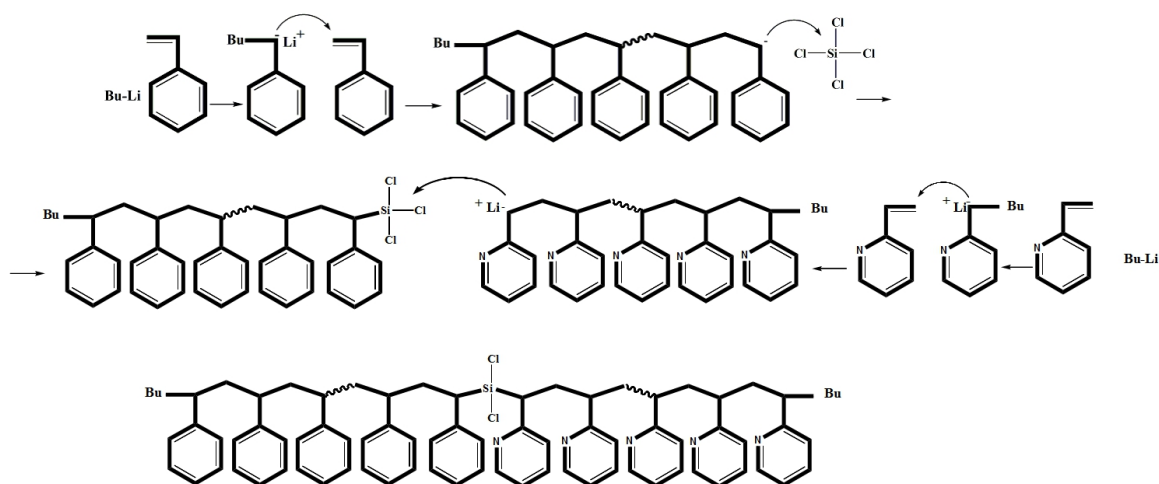
Las muestras se determinaron usando un TGA-DSC1 Mettler. Las medidas se llevaron a cabo en un rango de temperatura entre 25 °C y 700 °C en atmósfera de oxígeno para asegurar la total descomposición de los componentes orgánicos de la muestra.

Las medidas de magnetización se hicieron usando un SQUID clase MPMS de Quantum Design trabajando a 25 °C y escaneando campos magnéticos entre -5 T y 5 T.

La superficie específica de las nanopartículas magnéticas se calculó por el método de Isoterma de Brunauer, Emmett y Teller (BET) midiendo con un porosímetro Micrometrics ASAP 2020 versión 3.00.

*Síntesis del Copolímero Dibloque PS-*b*-P2VP*

Se sintetizó un copolímero dibloque con un grupo clorosilano reactivo entre ambos bloques, para ello se usó la polimerización aniónica en combinación con la química del clorosilano¹⁹. La polimerización del monómero 2-vinilpiridina, que contiene grupos funcionales, no es sencilla debido a las reacciones laterales por la elevada reactividad del carbanión²⁰. La preparación de los materiales se puede dividir en tres pasos. Primero, las cadenas de $\text{PS}^{(-)}\text{Li}^{(+)}$ se prepararon en una hora por polimerización aniónica del estireno, usando sec-BuLi como iniciador, con THF a -78°C como solvente, seguido de la sustitución del Li^{+} usando un largo exceso (1000:1) de tetraclorosilano (SiCl_4). Tras la sustitución completa de sólo un átomo de cloro por los extremos del polímero, el exceso de SiCl_4 se retira a través de una línea de alto vacío como se describe en la literatura¹⁹ dejando sólo el producto intermedio de PS-SiCl_3 . El tercer paso es la iniciación de la polimerización aniónica de 2-vinilpiridina a través de sec-BuLi en THF a -78°C en otro aparato de polimerización. Antes de completar la polimerización, se añadieron dos unidades monoméricas de estireno al sistema para evitar reacciones retroactivas debido al átomo de nitrógeno del grupo piridina aromático que queda adyacente al catión de litio. La incorporación de estireno modificado P2VP- Li^{+} se ajusta por una reacción de tritación selectiva sustituyendo sólo los tres átomos de cloro remanentes del PS-SiCl_3 , llevando al copolímero dibloque final $\text{PS-SiCl}_2\text{-P2VP}$ con un ratio de cadenas PS y P2VP 1:1. En todos los casos se utilizó THF anhidro como solvente, el cual se considera no selectivo para ambos segmentos (PS y P2VP respectivamente). En el Esquema 2.1 se muestra un resumen de la síntesis del copolímero.



Esquema 2.1. Representación esquemática de la síntesis del copolímero PS-*b*-P2VP

Síntesis de las nanopartículas magnéticas

Se sintetizaron nanopartículas magnéticas de 10 nm de diámetro usando el método de coprecipitación de Massart¹⁸. En resumen, una mezcla de 8.65 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3.12 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se dispersaron en 25 mL de agua mili-Q, se sonicó durante 1 hora, y después se añadió goteando con jeringuilla sobre 250 mL de una solución de NaOH 1.5 M con atmósfera de nitrógeno y temperatura ambiente, agitando mecánicamente a 2000 rpm durante 30 minutos. El cambio brusco de pH dio lugar a una precipitación de cristales de óxido de hierro pequeños. Dependiendo del ratio $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, se pueden obtener distintos tipos de óxidos de hierro (magnetita, maghemita y hematita). Además, con el objetivo de obtener nanopartículas de distintos tamaños, la temperatura de las síntesis se varió de 25 °C a 80 °C. Las nanopartículas magnéticas se separaron por decantación magnética y se lavaron con agua destilada, proceso que se repitió un mínimo de tres veces.

Síntesis de las Nanopartículas Magnéticas Surfactantes

Se disolvieron 5 g de PS-SiCl₂-P2VP en THF anhidro y se vertió sobre un frasco que contenía 75 mg de nanopartículas magnéticas. La mezcla se dejó reaccionando durante 5 días bajo sonicación. Una vez se completó la reacción, las nanopartículas se centrifugaron a 21000 rpm en THF anhidro durante tres horas, y posteriormente, se decantó el sobrenadante. Esta operación se repitió cinco veces. El producto resultante se liofilizó y analizó. Una representación de la reacción se puede ver en el Esquema 1.11.

2.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

2.3-1. Caracterización de las Nanopartículas Magnéticas

La coprecipitación de Massart a distintas temperaturas produjo nanopartículas magnéticas con un diámetro hidrodinámico comprendido entre 5 y 10 nm. La Figura 2.1 muestra una fotografía de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas magnéticas sintetizadas a una temperatura de 80 °C.

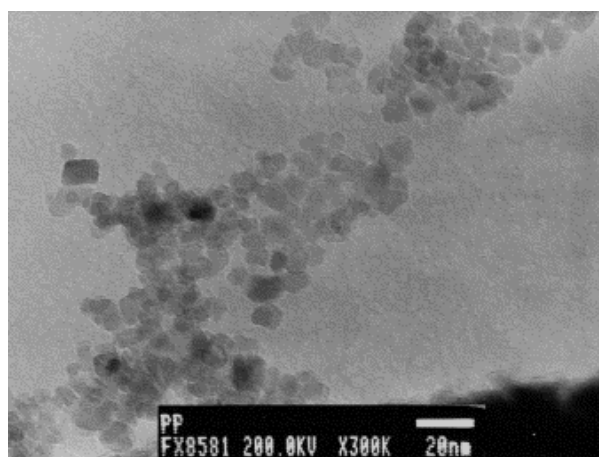


Figura 2.1. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas magnéticas sintetizadas a 80 °C, con un diámetro medio de 10 nm.

La Figura 2.2 representa el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas magnéticas obtenidas por espectroscopía de correlación fotónica en función de la temperatura de síntesis.

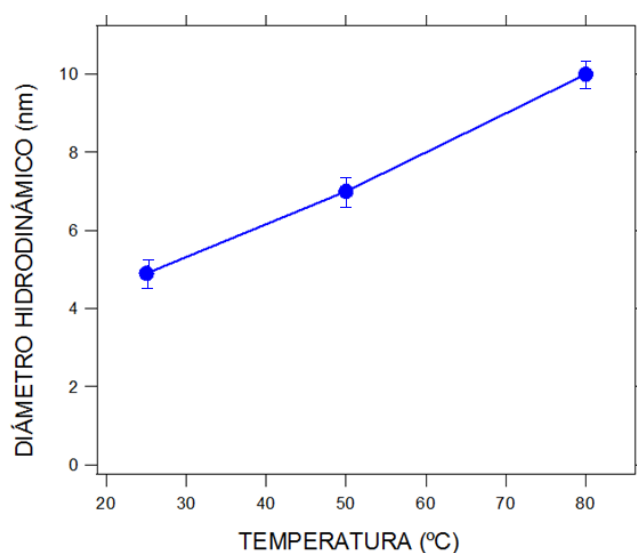


Figura 2.2. Diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas magnéticas obtenidas por espectroscopía de correlación fotónica en función de la temperatura de síntesis.

Se puede observar que el incremento de la temperatura de síntesis conduce a un incremento en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas tal y como ha sido reportado previamente por otros autores²¹⁻²³. Este resultado concuerda bien con la teoría de nucleación y cristalización la cual predice un incremento del tamaño de cristal cuando se eleva la temperatura de síntesis. La estructura cristalina de las nanopartículas se ha estudiado por difracción de rayos-X.

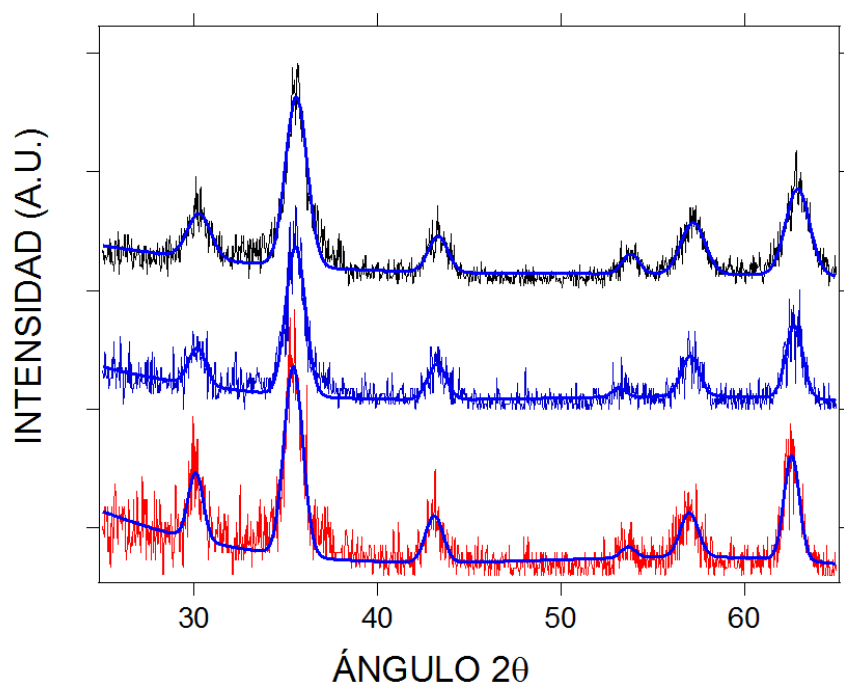


Figura 2.3. Patrones de difracción de Rayos-X de las nanopartículas magnéticas con distinto tamaño; rojo (10 nm de diámetro), azul (7 nm de diámetro) y negro (5 nm de diámetro).

Los patrones de difracción de las nanopartículas magnéticas con distinto tamaño se representan en la Figura 2.3. El espaciado- d de las reflexiones se calculó utilizando la ecuación de Bragg,

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad [2.1]$$

dónde λ es la longitud de onda de los rayos X ($\lambda=1.541 \text{ \AA}$), d es el espaciado entre planos y θ el ángulo de incidencia del haz de rayos X. Todos los picos de difracción detectados (ver Tabla 2.1) se atribuyen a la fase cúbica $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita) o a la cúbica Fe_3O_4 (magnetita).

Tabla 2.1. Cálculos del parámetro estructural medio utilizando la ecuación de Bragg y mediante la ecuación para sistemas cristalinos cúbicos.

$2\theta (^{\circ})$	30.34	35.65	43.54	53.082	57.54	63.02
$d(\text{\AA})$	2.944	2.517	2.078	1.702	1.601	1.474
(hkl)	(220)	(311)	(400)	(422)	(511)	(404)

El análisis Rietveld mostró que la fase $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ representa el 93% de la contribución cristalina siendo la fase cúbica Fe_3O_4 el 7%. Además, el parámetro de red calculado fue de $8.33 \pm 0.04 \text{ \AA}$ que es el más cercano al parámetro de red de la maghemita (8.351 \AA), que el de la magnetita (8.396 \AA).

El estudio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas se realizó utilizando la técnica de SQUID. La Figura 2.4 muestra el resultado experimental del momento magnético de las muestras obtenidas a diferentes temperaturas, en función del campo magnético aplicado.

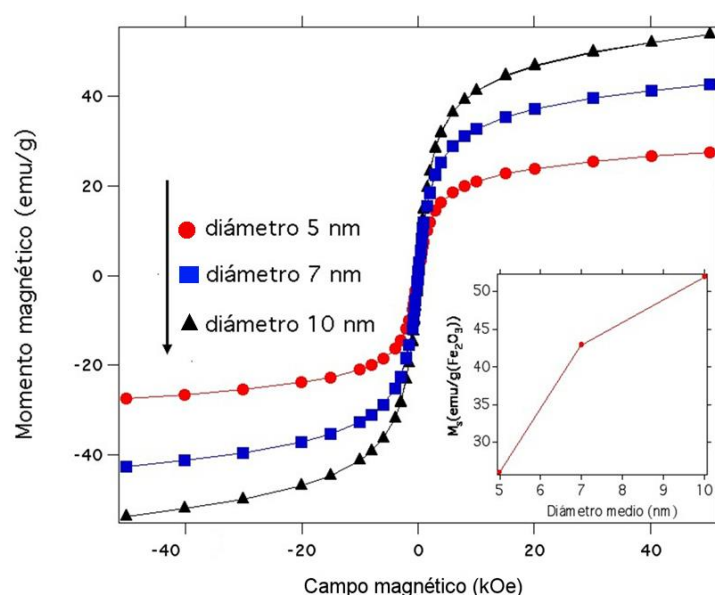


Figura 2.4. Momento magnético de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de distintos tamaños. El recuadro representa el máximo momento magnético frente al tamaño de las partículas.

Tal y como se puede observar en la Figura 2.4, las nanopartículas sintetizadas carecen de fenómenos de histéresis a bajo campo, lo que es una característica del comportamiento superparamagnético, sugiriendo así que cada nanopartícula está formada por un único dominio magnético, y por ello, son superparamagnéticas. Merece la pena fijarse en que el momento magnético de las nanopartículas no satura por completo a alto campo en el rango estudiado. El recuadro en la Figura 2.4 muestra la dependencia del máximo valor de momento magnético en función del diámetro de la nanopartícula. Teniendo en cuenta que las nanopartículas con un diámetro de 10 nm muestran el mayor momento magnético, son las que se utilizaron como núcleo inorgánico en la preparación del material híbrido.

2.3-2. Caracterización de las nanopartículas surfactantes

Para poder darles comportamiento anfifílico a las nanopartículas magnéticas, se llevó a cabo una modificación en su superficie inmovilizando PS-*b*-P2VP ($M_n = 14700$ g/mol, PDI = 1.04). Este copolímero tiene un grupo diclorosilano (Cl-Si-Cl) entre ambos bloques poliméricos el cual es reactivo frente a los grupos hidroxilo de la superficie de los óxidos de hierro (ver Esquema 1.11) dando como resultado el anclaje del copolímero a las nanopartículas de forma covalente. Los grupos hidroxílicos atacan al silicio, saliendo un cloruro y quedando unido el copolímero covalentemente a la superficie de las nanopartículas magnéticas.

La inmovilización del copolímero dibloque sobre la superficie de las nanopartículas se comprobó usando espectroscopía FTIR. Los resultados se muestran en la Figura 2.5.

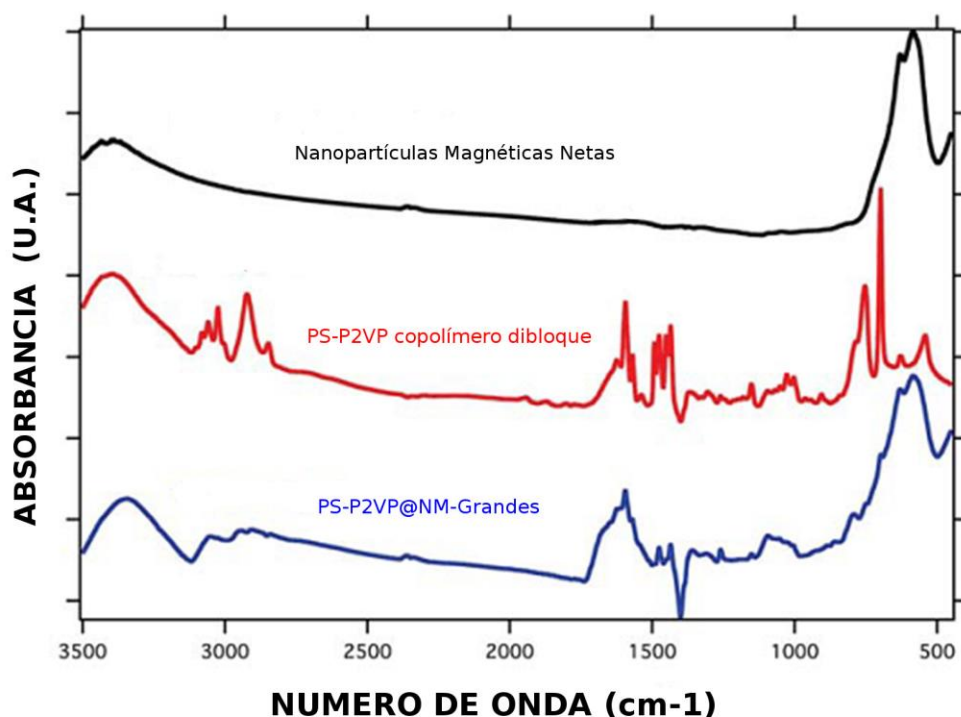


Figura 2.5. Espectros infrarrojos a) nanopartículas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin modificar (negro), b) polímero dibloque poli(estireno)-b-poli(2-vinilpiridina) (rojo) c) partículas de 10 nm de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcionalizadas con el copolímero (azul).

El espectro de FTIR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ muestran tres picos característicos a 3400 cm^{-1} , 637 cm^{-1} , y 572 cm^{-1} atribuidos a los grupos hidroxilo de la superficie de las nanopartículas, las uniones Fe-O-Fe y Fe-OH respectivamente²⁴. Se puede ver en la Figura 2.5 que el espectro de FTIR del copolímero puro es similar al de las nanopartículas magnéticas modificadas, con bandas de absorbancia a 698, 752, 788, 1436, 1477, 1594 y 3030 cm^{-1} característicos del poliestireno-co-poli(2-vinilpiridina). Además, se trató de adsorber el mismo copolímero dibloque sin el grupo reactivo silano en la superficie de la maghemita y los resultados de FTIR mostraron que tras la limpieza

se obtienen nanopartículas magnéticas sin copolímero, confirmando la funcionalización de las nanopartículas con el copolímero dibloque.

La micrografía de TEM en la Figura 2.6 muestra la disposición del polímero alrededor de las nanopartículas magnéticas, dónde es fácil observar una corona de polímero de PS-*b*-P2VP rodeando las nanopartículas.

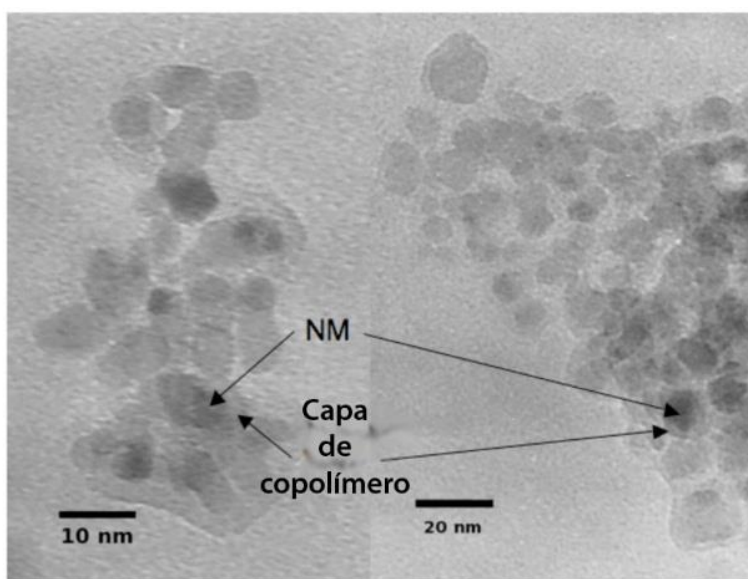


Figura 2.6. Imagen TEM en la cual se observan las nanopartículas magnéticas (NM) y velos de copolímero alrededor de su superficie

La corona de polímero se hincha en disolventes apropiados como THF incrementando el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas híbridas. La Figura 2.7 muestra el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas magnéticas mediante espectroscopía de correlación fotónica (DLS) antes y después de ser funcionalizadas en superficie con el copolímero dibloque.

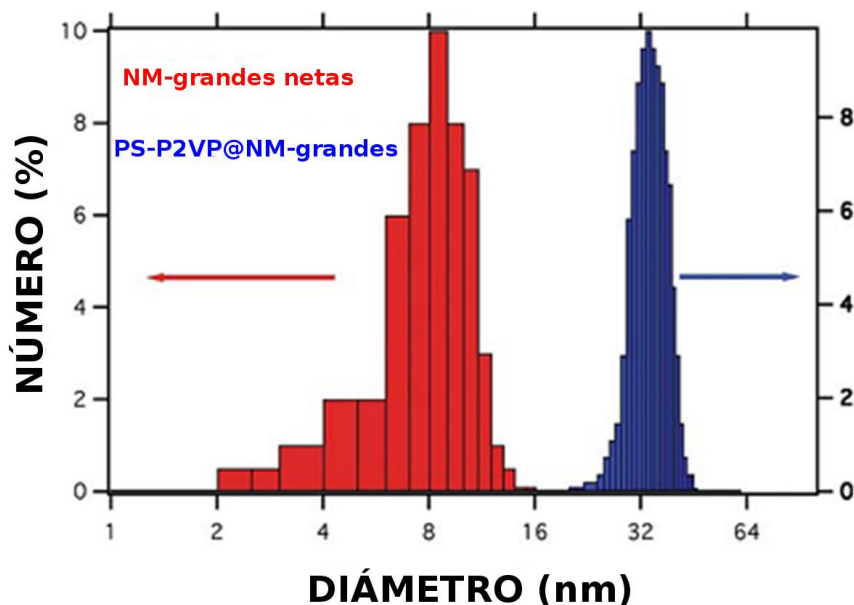


Figura 2.7. Diámetro de las nanopartículas magnéticas de 10 nm antes (rojo) y después (azul) de la funcionalización. Las medidas se llevaron a cabo en THF que es buen solvente para poliestireno y para poli-2vinilpiridina.

Como se puede ver en la Figura 2.7, el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas funcionalizadas se eleva de 10 nm a 34 nm, incremento que es razonable considerando que el peso molecular promedio en número del polímero por unidad (M_n) es ~ 14000 g/mol. Por otro lado, el DLS mide el diámetro hidrodinámico resultante del tamaño del núcleo inorgánico y la corona de polímero que se hincha en un buen disolvente incrementando el diámetro de las nanopartículas. En cambio, en las condiciones de alto vacío del TEM las nanopartículas magnéticas están recubiertas por una fina capa de polímero colapsado y por ello sus diámetros son menores a los 34 nm observados por DLS. El Esquema 2.2 representa la ordenación del copolímero alrededor de la nanopartícula y el grosor estimado de cada capa.

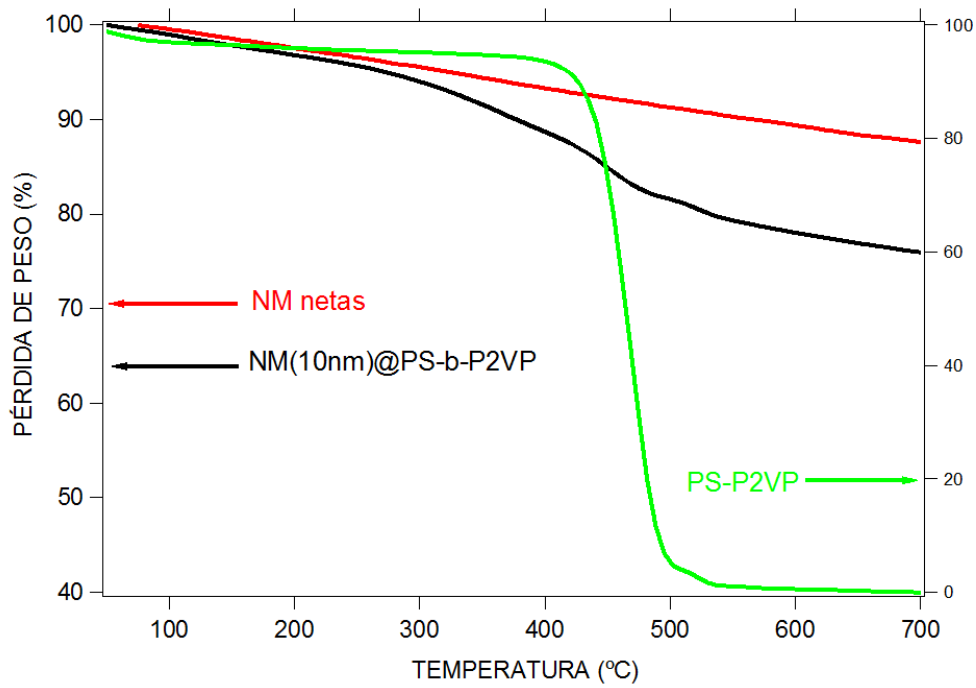


Figura 2.8. Análisis termogravimétrico de: (a) nanopartículas de maghemita netas (rojo), (b) nanopartículas de maghemita funcionalizadas (negro), y (c) copolímero dibloque de poliestireno-co-poli(2-vinilpiridina) (verde)

El área específica de las nanopartículas híbridas se midió con BET y el resultado fue de 93 m²/g. Luego, el número de densidad de cadenas se obtiene por la siguiente ecuación

$$\rho \left(\text{cadenas}/\text{nm}^2 \right) = \frac{\Delta \text{peso}_{TGA} \times 6.022 \cdot 10^{23}}{PM_{\text{polímero}} \times \text{Sup}_{BET} \left(\frac{\text{nm}^2}{\text{g}} \right)} \quad [2.2]$$

donde ρ (cadenas/nm²) es la densidad de cadenas inmovilizadas por nm², Δpeso_{TGA} se corresponde con la pérdida de peso debida a la descomposición de la materia orgánica, $PM_{\text{polímero}}$ es el peso molecular del polímero e igual a 14000 g/mol y Sup_{BET} es la superficie específica de un gramo de partículas obtenida por BET. De la expresión de arriba, se obtiene una densidad de cadenas de 0.046 cadenas/nm². Asumiendo que las

nanopartículas magnéticas son esferas de 10 nm de diámetro, se puede calcular un promedio de 15 cadenas inmovilizadas por nanopartícula.

Este copolímero fue elegido por su miscibilidad selectiva en distintos disolventes debido a ambos bloques poliméricos: el poliestireno es soluble en tolueno pero insoluble en agua ligeramente ácida, mientras que la poli(2-vinilpiridina) es insoluble en tolueno pero soluble en agua a pH=4. En una dispersión de tolueno-agua los bloques se posicionan de tal forma que la mayoría de los bloques de poliestireno estarían orientados hacia la fase orgánica mientras que los bloques de poli(2-vinilpiridina) estarían orientados hacia la fase acuosa permitiendo la creación de una emulsión con las nanopartículas magnéticas en la interfaz. La naturaleza anfifílica de las nanopartículas híbridas se investigó midiendo el ángulo de contacto de una película preparada con nanopartículas magnéticas funcionalizadas en presencia de tolueno (buen solvente para el poliestireno), agua a pH=4 (buen solvente para poli(2-vinilpiridina)), y agua a pH=7 (mal solvente para ambos polímeros). La Figura 2.9 muestra el perfil de una gota y un esquema de la reorganización que sufren las cadenas de polímero en contacto con los diferentes solventes²⁸⁻³⁰.

Los ángulos de contacto obtenidos para las nanopartículas híbridas fueron de 7.4° para tolueno, 7.1° para agua a pH = 4, y 76,6° para agua a pH = 7. Estos valores son muy diferentes de los medidos para las nanopartículas sin polímero: 32° para tolueno, 15° para agua a pH = 4, y 20° para agua a pH = 7. Como se puede ver en la Figura 2.9, en tolueno las cadenas de poliestireno se expanden mientras que las cadenas de poli(2-vinilpiridina) colapsan. La situación se invierte en el caso de agua a pH = 4. Sin embargo, con el agua a pH = 7 ambos polímeros colapsan disminuyendo su mojado. Este resultado

muestra que el copolímero dibloque inmovilizado otorga características anfifílicas a las nanopartículas y esta propiedad fue utilizada para preparar una emulsión magnética o/w de tolueno en agua a pH = 4. Como se ilustra en el Esquema 2.3, las nanopartículas magnéticas permanecen en la interfaz de la gota con las cadenas de poliestireno extendidas hacia el tolueno y las cadenas de poli(2-vinilpiridina) hacia la fase acuosa, estabilizando así la emulsión.

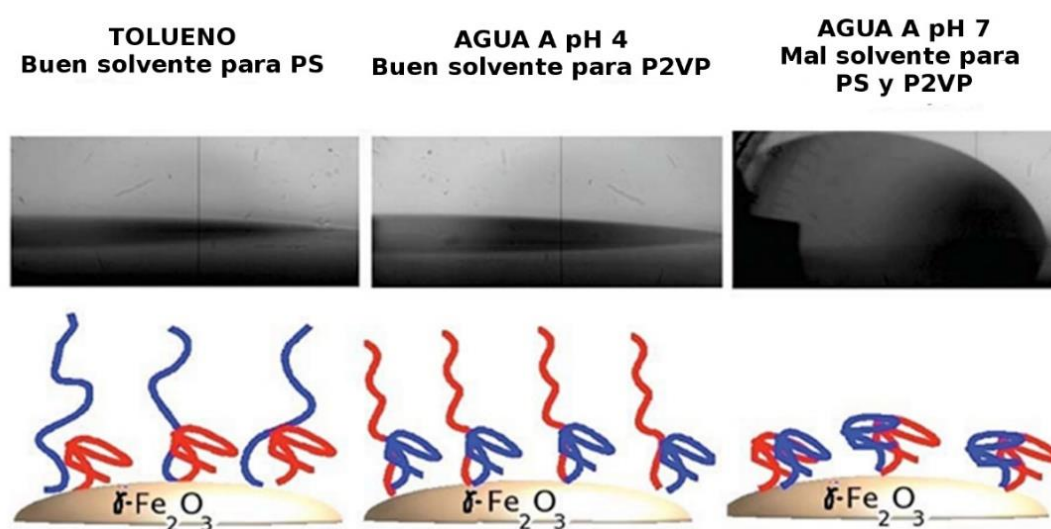


Figura 2.9. En la parte superior, fotografías obtenidas de los ensayos de ángulo de contacto de la película formada por nanopartículas funcionalizadas en presencia de tolueno, agua a pH 4, y agua a pH 7. En la parte inferior, situación esquemática de las cadenas de copolímero.

La parte izquierda de la Figura 2.10 muestra una fotografía de microscopía óptica de una emulsión de tolueno en agua a pH = 4 estabilizada con las nanopartículas surfactantes. Como se muestra en la parte derecha de la Figura 2.10, en presencia de un campo magnético externo, las gotas de la emulsión se distorsionan y alinean en la dirección de las líneas del campo magnético.

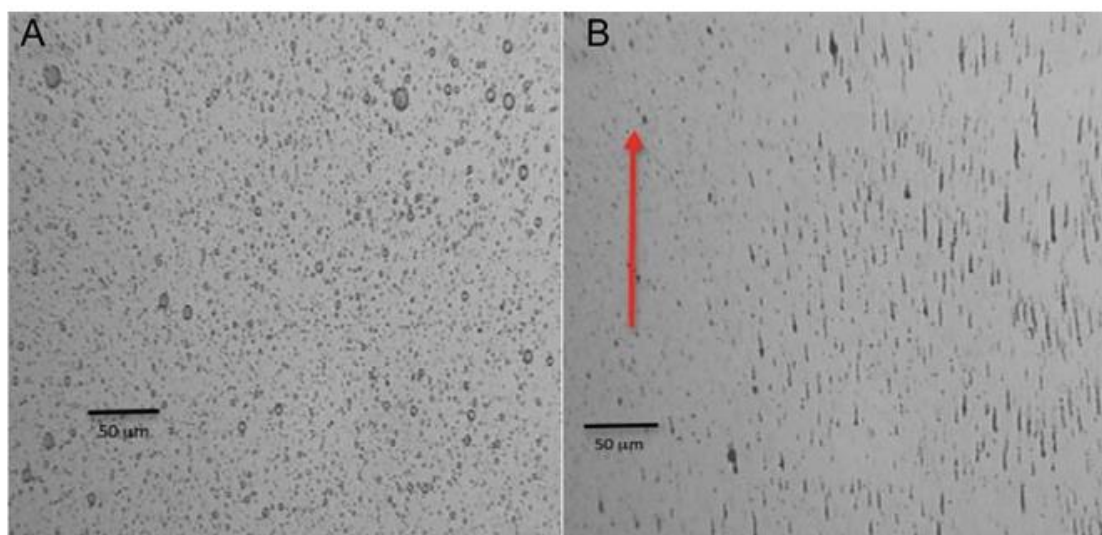
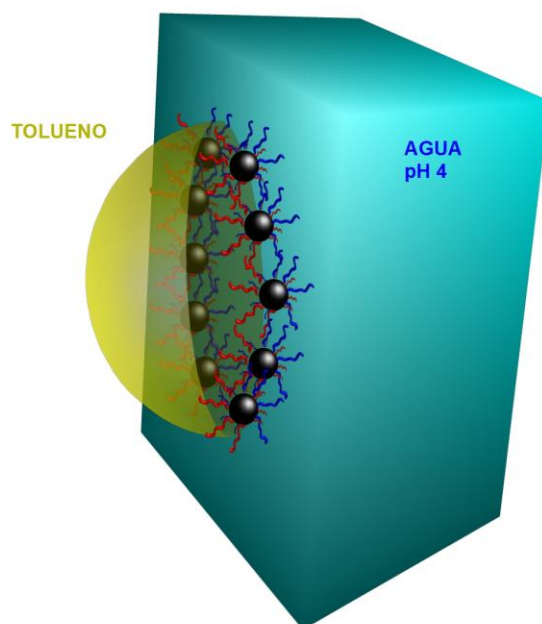


Figura 2.10. Imágenes de Microscopía óptica de una emulsión de tolueno en agua (pH 4) estabilizada con nanopartículas magnéticas funcionalizadas: (A) gotas de la emulsión en ausencia de un campo magnético y (b) gotas de la emulsión orientadas en presencia de un campo magnético externo. La flecha en rojo indica la dirección del campo.

En la emulsión preparada con las nanopartículas magnéticas funcionalizadas, las gotas presentan una interfaz oscura intensa indicando que la mayoría de las nanopartículas están situadas en la interfaz tolueno agua. Estos resultados ilustran cómo las nanopartículas surfactantes se pueden usar para estabilizar emulsiones y otorgarles estructura en presencia de un campo magnético. En la TDC 1 puede apreciarse la emulsión formada y cómo ésta ha sido atraída por el campo magnético.

Una posible estructura de la emulsión así formada podría ser la representada en el Esquema 2.2. En este modelo, la disposición de las nanopartículas híbridas quedaría en la interfase de la gotícula; las cadenas de poliestireno se extienden hacia el tolueno y junto con las de poli(2-vinilpiridina), que se extienden hacia el medio acuoso, condicionan la orientación de dicho sistema, estabilizando así la emulsión.



Esquema 2.2. Representación de una gota de tolueno emulsificada en agua a pH 4 debido a las nanopartículas magnéticas funcionalizadas (negro) con el copolímero de poliestireno (azul) y poli(2-vinilpiridina) (rojo).

2.4 – CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Hemos sintetizado nanopartículas magnéticas con un tamaño medio de 10 nm. Estas nanopartículas magnéticas se funcionalizaron con un copolímero anfifílico de poliestireno-*b*-poli(2-vinilpiridina) con un puente diclorosilano, que contribuye a la estabilidad coloidal de las nanopartículas y les da propiedades de miscibilidad selectiva. Estas nanopartículas se han utilizado como surfactantes magnéticos en la preparación de emulsión (o/w) cuya fase interna responde a la presencia de un campo magnético.

2.5 - REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

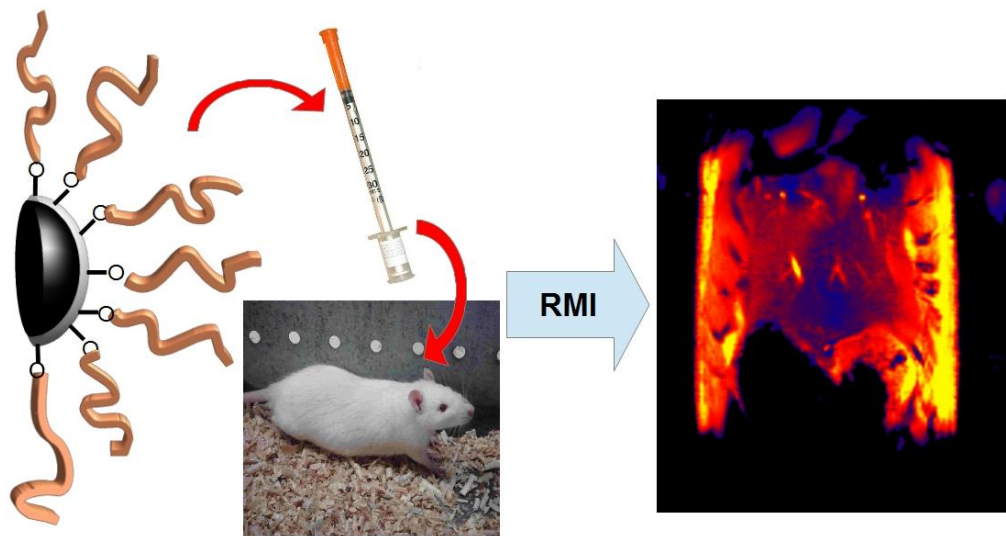
- 1- Chithrani, D.; Ghazani, A.; Warren, C. W. *Nano Lett* 2006, 6, 662–668.
- 2- Wang, Y.; Wong, J. F.; Teng, X.; Zhang Lin, X.; Yang, H. *Nano Lett* 2003, 3, 1555–1559.
- 3- Fornara, A.; Johansson, P.; Petersson, K.; Gustafsson, S.; Qin, J.; Olsson, E.; Ilver, D.; Krozer, A.; Muhammed, M.; Johansson, C. *Nano Lett* 2008, 8, 3423–3428.
- 4- Agrawal, M.; Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Gaponik, N.; Gupta, S.; Cimrova, V.; Lesnyak, V.; López-Cabarcos, E.; Tzavalas, S.; Rojas-Reyna, R.; Eychmuüller, A.; Stamm, M. *Langmuir*, 2008, 24, 9820–9824.
- 5- Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. *J Phys Chem C* 2008, 112, 4954–4960.
- 6- Nagarajan, R. *ACS Symp Ser* 2008, 996, 2–14.
- 7- Young Park, J.; Sook Choi, E.; Ju Baek, M.; Lee, G. H. *Mater Lett* 2009, 63, 379–381.
- 8- Zhu, A.; Yuan, L.; Liao, T. *Int J Pharm* 2008, 350, 361–368.
- 9- Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Serafinelli, C.; Rojas-Reyna, R.; Voit, B.; López-Cabarcos, E.; Stamm, M. *Langmuir* 2007, 23, 10280–10285.
- 10- Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Frick, B.; Seydel, T.; López-Cabarcos, E. *Langmuir* 2010, 26, 7101–7106.
- 11- Hinrichs, W. L. J.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van de Wetering, P.; Hennink, W. E. *J Control Release* 1999, 60, 249–259.
- 12- Yezhelyev, M. V.; Gao, X.; Xing, Y.; Al-Hajj, A.; Nie, S.; M O'Regan, R. *Oncol L* 2006, 7, 657–667.
- 13- Zhu, A.; Yuan, L.; Jin, W.; Dai, S.; Wang, Q.; Xue, Z.; Qin, A. *Acta Biomater* 2009, 5, 1489–1498.
- 14- Fortina, P.; Kricka, L. J.; Graves, D. J.; Park, J.; Hyslop, T.; Tam, F.; Halas, N.; Surrey, S.; Waldman, S. A. *Trends Biotechnol* 2007, 25, 145–152.
- 15- Liu, Z.; Liu, Y.; Yang, H.; Yang, Y.; Shen, G.; Yu, R. *Anal Chim Acta* 2005, 533, 3–9.
- 16- Nam, J.; Taxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* 2003, 301, 1884–1886.
- 17- Lu, M.; Ibraimi, F.; Kriz, D.; Kriz, K. *Biosens Bioelectron* 2006, 21, 2248–2254.
- 18- Massart, R. *IEEE Trans Magn* 1981, 17, 1247–1248.
- 19- Uhrig, D.; Mays, J. W. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2005, 43, 6179–6222.
- 20- Kadhumi, A. A.; Sebo, N. H.; Jabrael, F. H.; Ibraheim, A. H. *J Thermal Analysis* 1992, 38, 2359–2367.

- 21- Yan, H.; Zhang, J.; You, C.; Song, Z.; Yu, B.; Shen, Y. *Mater Chem Phys* 2009, 113, 146–152.
- 22- Qu, Y.; Yang, H.; Yang, N.; Fan, Y.; Zhu, H.; Zou, G. *Mater Lett* 2006, 60, 3548–3552.
- 23- Maaz, K.; Karim, S.; Mumtaz, A.; Hasanain, S. K.; Liu, J.; Duan, J. L. *J Magn Mater* 2009, 321, 1838–1842.
- 24- Zboril, R.; Bakandritsos, A.; Mashlan, M.; Tzitzios, V.; Dallas, P.; Trapalis, C.; Pedridis, D. *Nanotechnology* 2008, 18, 95602–95610.
- 25- Garcia, I.; Zafeiropoulos, N. E.; Janke, A.; Tercjak, A.; Eceiza, A.; Stamm, M.; Mondragon, I. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2007, 45, 925–932.
- 26- Garcia, I.; Tercjak, A.; Zafeiropoulos, N. E.; Stamm, M.; Mondragon, I. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2007, 45, 4744–4750.
- 27- Motornov, M.; Sheparovych, R.; Lupitskyy, R.; MacWilliams, E.; Luzinov, O.; Hoy, I.; Minko, S. *Adv Funct Mater* 2007, 17, 2307–2314.
- 28- Synytska, A.; Ionov, L.; Dutschk, V.; Stamm, M.; Grundke, K. *Langmuir* 2008, 24, 11895–11901.
- 29- Houbenov, N.; Minko, S.; Stamm, M. *Macromolecules* 2003, 36, 5897–5901.
- 30- Sidorenko, A.; Minko, S.; Schenk-Meuser, K.; Duschner, H.; Stamm, M. *Langmuir* 1999, 15, 8349–8355.

RESULTADOS

CAPÍTULO 3

SISTEMA HÍBRIDO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS



TDC 2. Utilización del sistema híbrido como agente de contraste en rata.

3.- RESUMEN

“En este capítulo mostramos la síntesis, caracterización y posible aplicación como sistema de liberación de principios activos dirigida magnéticamente, de micropartículas híbridas formadas por nanopartículas magnéticas incorporadas dentro de partículas de poli(ϵ -caprolactona). El magnetismo de las micropartículas permite su localización dentro del cuerpo usando resonancia magnética de imagen (RMI), y la capa de polímero biodegradable permite atrapar principios activos que pueden liberarse cuando se incrementa la temperatura. La síntesis del material híbrido se llevó a cabo usando la técnica de “injerto desde” de nanopartículas magnéticas modificadas convenientemente. Posteriormente, las nanopartículas híbridas resultantes, se ensamblaron en partículas esféricas de 138 ± 49 nm vía técnica de precipitación, pasando a constituir micropartículas. El material híbrido producido se evaluó como sistema de liberación de principios activos sensible a estímulos en el cual la liberación del principio activo se disparó mediante inducción magnética. Tras esto, las micropartículas se inyectaron en ratas y se monitorizó su localización dentro del animal usando las inhomogeneidades de campo locales generadas por las partículas mediante RMI.”

3.1- INTRODUCCIÓN

Una aplicación prometedora de las nanopartículas magnéticas se da en diagnóstico y terapia, ya que las propiedades magnéticas pueden ser usadas para concentrar un principio activo en un tejido específico, revelar su posición dentro del cuerpo por resonancia magnética de imagen y además facilitar la liberación del principio

activo por medio de un campo magnético alterno¹⁻³. Estas capacidades han llevado al mundo científico a buscar distintas estrategias que podrían permitir el desarrollo de sistemas inteligentes de liberación de principios activos sensibles a campos magnéticos⁴. El poder dirigir un principio activo hacia un tejido concreto y poder comenzar su liberación de una forma controlada, podría reducir la cantidad de efectos secundarios asociados a ese principio activo, algo común en los tratamientos anticancerígenos⁵⁻¹¹.

Acerca de las formas de liberar un principio activo aplicando un campo magnético externo, se pueden encontrar dos métodos diferentes. Uno de ellos se le denomina “liberación de un principio activo controlado por hipertermia a través de roturas de enlace”. En este mecanismo, la molécula principio activo está anclada al sistema a través de un enlace termosensible y se libera cuando dicho enlace se rompe por calentamiento¹². Un segundo mecanismo se denomina “liberación de un principio activo controlado por hipertermia a través de permeabilidad mejorada”. Dentro de esta estrategia, podemos encontrar algunos artículos que modulan la liberación mediante la formación de roturas o defectos en la matriz polimérica^{13,14} que mejora la liberación del principio activo. Otros ejemplos explotan el comportamiento LCST de algunos polímeros que les permite reducir su volumen tras incrementar la temperatura¹⁵ comportándose como una bomba de expulsión liberando el principio activo en respuesta a un campo magnético alternante.

Un nuevo método que se ha investigado menos, podría estar basado en el uso de un material polimérico de baja temperatura de fusión en el cual se encapsularía el fármaco. Así, cuando el polímero se funde, el coeficiente de difusión sería mucho mayor que el coeficiente de difusión del principio activo en el polímero sólido. Esta estrategia

de liberación de fármacos requiere nanopartículas con un núcleo que pueda proporcionar la respuesta magnética y una cubierta^{16,17} que pueda servir para encapsular el principio activo y permitir su liberación. Esta cubierta podría hacerse usando poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ya que este polímero es biodegradable, biocompatible y tiene una baja temperatura de fusión¹⁸ que puede ser alcanzada con hipertermia.

En este capítulo, se muestra la síntesis y caracterización de micropartículas híbridas magnéticas que pueden usarse para los propósitos anteriormente expuestos. La síntesis de estas micropartículas se llevó a cabo por la técnica de “*injerto desde*” de nanopartículas magnéticas convenientemente cubiertas preparadas de acuerdo con los métodos reportados por Schmidt¹⁹. Esta reacción produce nanopartículas de Fe_3O_4 cubiertas con una capa de PCL. En función de las condiciones de síntesis, es posible variar la cantidad de polímero anclado desde el 4% al 40% en la superficie de las nanopartículas. Posteriormente, las nanopartículas modificadas con PCL se dispersaron en tetrahidrofurano (THF, buen solvente para la PCL) y se autoensamblaron en micropartículas siguiendo la técnica de precipitación descrita por Fraylich y colaboradores²⁰.

Las micropartículas se ensayaron como sistema inteligente de liberación de cumarina, un principio activo que se detecta fácilmente por espectrofluorometría, el cual fue atrapado dentro de las partículas con una eficacia de carga del 25%. Tras esto, las partículas se sometieron a un campo magnético alternante, que se usó como estímulo externo para la liberación de cumarina. Finalmente las partículas se inyectaron

en ratas y se monitorizó su localización por RMI. El sistema propuesto en este capítulo sería viable para ser usado en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

3.2- MATERIALES Y MÉTODOS

3.2-1. Materiales

Los precursores de cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) se obtuvieron de Panreac. El monómero ϵ -caprolactona y el monooleato de poli(oxietilen)-20-sorbitan se obtuvieron de Fluka. Los solventes se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin purificaciones posteriores.

Se compró un imán comercial de 0.4 T de www.aimangz.com con el objetivo de usarlo en la recuperación de las nanopartículas magnéticas dispersas en el agua.

3.2-2. Métodos

Además de los métodos descritos en 2.2.2, en este trabajo se utilizaron los descritos a continuación.

Para las medidas de DLS, la suspensión de partículas se diluyó a concentración 0.02 % en peso para prevenir dispersiones múltiples y descartar interacciones coloidales. El coeficiente medio de difusión se derivó de la intensidad de la función de correlación y luego el tamaño medio de partícula se calculó usando la ecuación de Einstein-Stokes.

Los espectros de infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) se tomaron con un espectrómetro Nicolet IR200 equipado con un dispositivo de reflexión total atenuada

(ATR) conteniendo un cristal ZnSe (Foundation SepeculATR). El espectro del blanco se tomó antes de cada muestra y fue posteriormente sustraído.

Las medidas de fluorescencia de la cumarina se llevaron a cabo con un espectrofluorómetro Jasco FP-6300 usando una longitud de onda de excitación a 420 nm.

Los tiempos de relajación se midieron en un Minispec MQ60 (Bruker, Ettlingen, Germany) a 37 °C y 1.5 T de campo magnético para evaluar la eficacia de las suspensiones como agentes de contraste para RMI.

Las resonancias magnéticas de imagen (RMI) se llevaron a cabo usando un escáner Bruker Biospec 7 T/20 cm con un gradiente de fuerza máximo de 750 mT/m. Se usó para estudios de imagen una bobina de cuadratura de volumen comercial. Se usaron ratas macho adultas Wistar (de 6 a 8 semanas de edad con un peso medio de 300 g, n = 2, de la propia colonia de cría stock). Se anestesiaron con un gas mezcla de oxígeno y 5-6% de sevoflurano. La concentración de anestésico se redujo al 1% para la adquisición de RMI *in vivo*. La frecuencia respiratoria y la temperatura corporal se monitorizaron y registraron constantemente con un sistema de monitorización animal pequeño compatible con RMI. La temperatura corporal se mantuvo a 36.5 °C y la frecuencia respiratoria fue de aproximadamente 50 bpm por el ajuste de la mezcla gaseosa. La suspensión de nanopartículas se inyectó por la vena de la cola (85 µmol Fe/Kg peso corporal). Inmediatamente tras la inyección de las nanopartículas, la frecuencia respiratoria bajó hasta alrededor de 30 bpm pero recobró la frecuencia normal rápidamente. Se adquirieron imágenes coronales T2*-pesadas de la zona abdominal con una secuencia de eco gradiente 3.28/50ms TE/TR, campo de visión de 6 x 6 cm², una media de seis, y 256 x 128 de matriz de adquisición.

Síntesis y modificación en superficie de las nanopartículas magnéticas

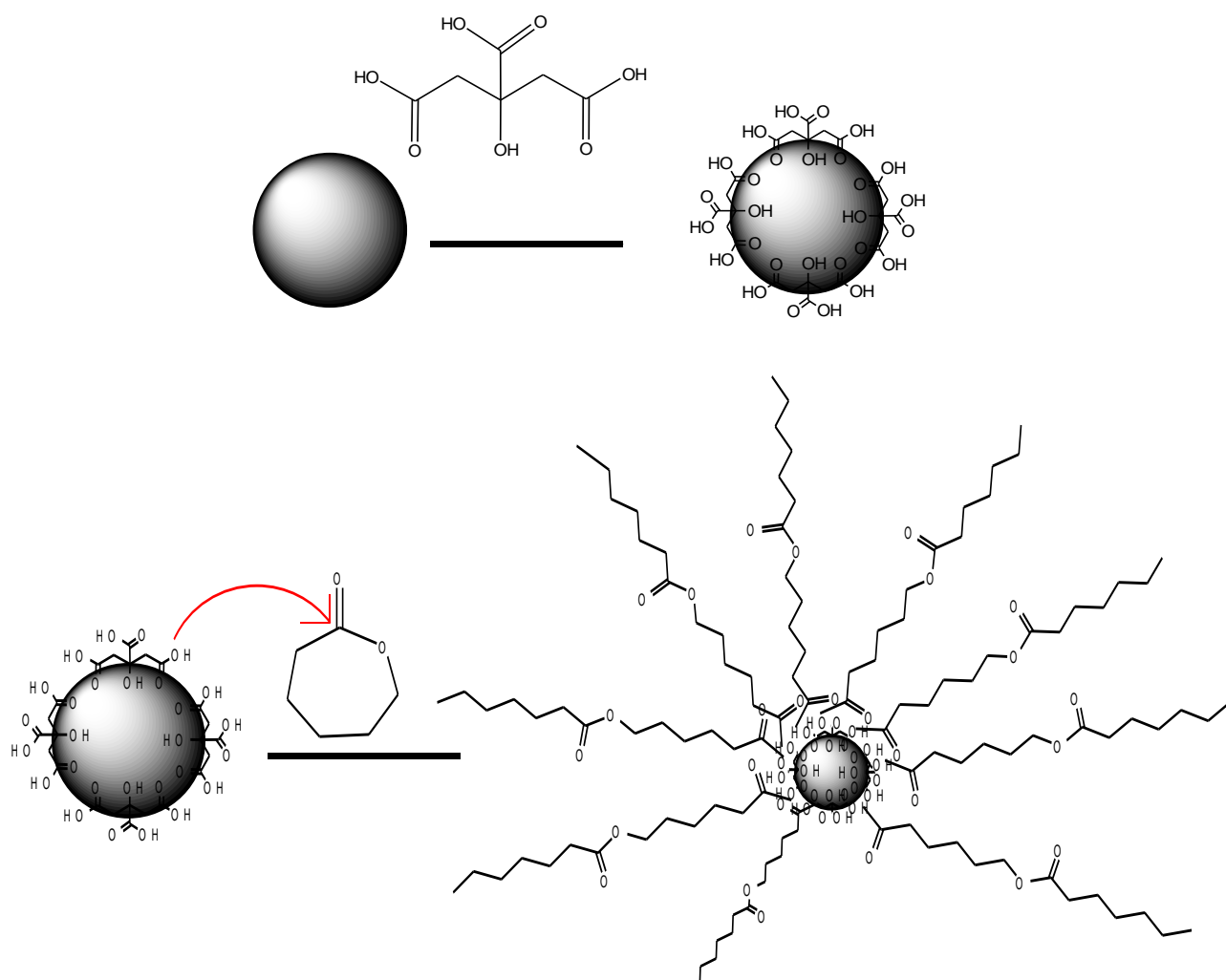
Las nanopartículas magnéticas de 5 nm de diámetro se sintetizaron mediante el método de coprecipitación de Massart²¹. Para ello, una mezcla de 8.65 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3.12 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se dispersaron en 25 mL de agua milli-Q y se sonicaron durante 1 hora. Posteriormente se añadieron goteando sobre una solución de NaOH 1.5 M en atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente. Se mantuvo en agitación durante 30 minutos. El cambio repentino en el pH conduce a la precipitación de pequeños cristales de óxido de hierro y en función del ratio $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, se puede obtener magnetita, maghemita y hematita. Las nanopartículas se separaron por decantación magnética y se lavaron con agua destilada un mínimo de tres veces. Tras ello, se recubrieron con ácido cítrico con el objetivo de anclar grupos hidroxilo en su superficie, los cuales podrían servir como iniciadores durante la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona. Antes de comenzar la polimerización, la dispersión obtenida se sometió a separación magnética y el precipitado magnético se redispersó en una solución de 200 mL de ácido cítrico (0.3M) y se agitó mecánicamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, las nanopartículas se precipitaron con acetona, se eliminó el exceso de ácido cítrico, mediante el uso de un imán, y se liofilizaron. Los experimentos de TGA mostraron que la cantidad de ácido cítrico inmovilizado en la superficie de las partículas fue de alrededor del 9.5%.

Síntesis de las nanopartículas de PCL@Fe₃O₄

La síntesis de las nanopartículas de PCL@Fe₃O₄ se llevó a cabo en dos pasos. Primero las nanopartículas PCL@Fe₃O₄ se produjeron por la técnica “injerto desde”

usando los grupos hidroxilo del ácido cítrico anclado en la superficie de las nanopartículas magnéticas para iniciar la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona. En una síntesis típica, 0.1 mmol de nanopartículas magnéticas modificadas con ácido cítrico, se sonicaron en 10 mL de (dimetilformamida) DMF en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. Posteriormente, la dispersión de nanopartículas se situó en un placa calefactora con agitación mecánica y se llevó hasta 80 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se añadieron distintos volúmenes de ϵ -caprolactona junto con 1 mg de trifluorometanosulfonato Sn(II). La reacción se mantuvo durante 24 horas. Finalmente las nanopartículas magnéticas híbridas se separaron del monómero que no reaccionó por decantación magnética. Este paso se repitió cuatro veces para asegurar la completa recuperación de las nanopartículas magnéticas. El Esquema 3.1 resume el camino de síntesis para obtener las nanopartículas de PCL@Fe₃O₄.

Para controlar la cantidad de policaprolactona sintetizada en la superficie, se usaron distintos ratios nanopartícula magnética / ϵ -caprolactona. La Tabla 3.1 muestra la cantidad de cada componente usada en las distintas reacciones y la cantidad de policaprolactona inmovilizada en la superficie de las nanopartículas magnéticas medido gracias a TGA.



Esquema 3.1. Representación esquemática de la funcionalización de las nanopartículas magnéticas con ácido cítrico y posterior polimerización de ϵ -caprolactona sobre las mismas.

Los resultados de TGA indicaron que cuando la concentración de ϵ -caprolactona es mayor de 90 mmol, la cantidad de PCL inmovilizada en la superficie de las nanopartículas permanece casi constante. Esto se atribuyó a un exceso de monómero con respecto a los grupos hidroxilo en la superficie de las nanopartículas que actúan como puntos de inicio de la polimerización, de manera que no se pueden iniciar más polimerizaciones y el crecimiento del polímero permanece casi constante en el momento de parar la reacción aunque se utilice más monómero.

Tabla 3.1: Descripción de la cantidad de nanopartículas magnéticas, monómero, catalizador y crecimiento de policaprolactona en la superficie de las nanopartículas.

Nombre de Síntesis	Nanopartículas Magnéticas (g)	ϵ -Caprolactona (mmol)	Sn ^{II} (Trifluorometanosulfonato) (μ mol)	PCL Inmovilizada (%)
PCL@Fe ₃ O ₄ -1	0.1	17	2	4
PCL@Fe ₃ O ₄ -2	0.1	35	2	9
PCL@Fe ₃ O ₄ -3	0.1	50	2	20
PCL@Fe ₃ O ₄ -4	0.1	70	2	30
PCL@Fe ₃ O ₄ -5	0.1	90	2	42
PCL@Fe ₃ O ₄ -6	0.1	100	2	45

Las nanopartículas de PCL@Fe₃O₄ se ensamblaron en micropartículas usando una ligera modificación de la técnica de precipitación descrita por Fraylich y colaboradores²⁰. Para ello, 10 mg de nanopartículas modificadas con policaprolactona, se dispersaron en una mezcla de 2 mL de THF con 25 μ L de Tween 80 y se goteó en 20 mL de agua miliQ con agitación mecánica, dando como resultado una dispersión acuosa de las micropartículas.

Carga del sistema con cumarina

La encapsulación de la cumarina en las micropartículas se llevó a cabo dispersando 65 mg de PCL@Fe₃O₄ en 2 mL de THF con 100 μ L de Tween 80 y 100 μ L de una solución en etanol (0.4 mg/ml) de cumarina. Cuando esta mezcla se añade goteando sobre 50 mL de agua miliQ, la cumarina queda atrapada dentro de las micropartículas

que se han formado por agregación. Las micropartículas resultantes se recogieron por decantación magnética y se lavaron con agua miliQ al menos tres veces.

La cantidad de cumarina atrapada dentro de las micropartículas de PCL@Fe₃O₄ magnéticas con policaprolactona se determinó dispersando una cantidad conocida de micropartículas en THF con el fin de redissolver el polímero y liberar la cumarina. Tras agitar durante más de 1 hora, se precipitaron magnéticamente las micropartículas de forma que se obtiene en el sobrenadante la cumarina atrapada en el mismo. La concentración de cumarina se calculó por absorbancia a 282 nm atendiendo a una curva de calibrado previamente preparada.

3.3- RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.3-1. Caracterización de las Nanopartículas Magnéticas

Para evaluar el éxito en la síntesis de las micropartículas se caracterizaron en distintos pasos del proceso. La Figura 3.1 muestra una fotografía de TEM. La Figura 3.2(A) muestra un patrón de difracción de electrones (SAED), mientras que la Figura 3.2(B) muestra la curva de magnetización de las nanopartículas magnéticas.

La fotografía de TEM de la Figura 3.1 muestra que las nanopartículas magnéticas sintetizadas son relativamente monodispersas con unos tamaños comprendidos entre 5 y 10 nm y con unos diámetros medios de partícula de 6.2 ± 1.2 nm.

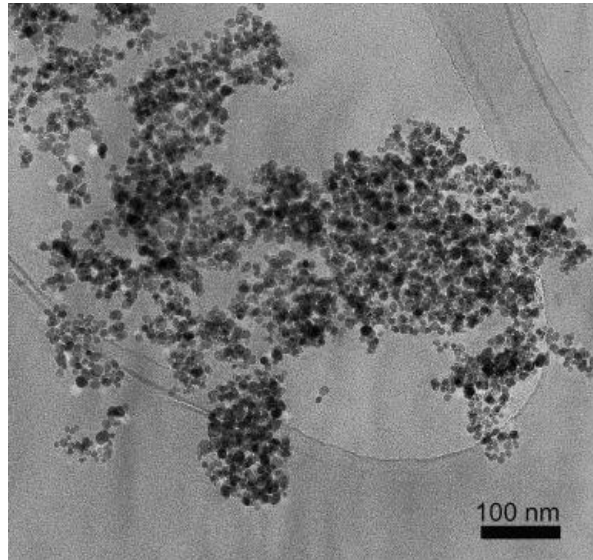


Figura 3.1. Micrografía de TEM de las nanopartículas magnéticas originales

El patrón de difracción de las nanopartículas magnéticas presentados en la Figura 3.2(A) permite calcular el espaciado- d usando la siguiente ecuación:

$$L \cdot \lambda = d \cdot R \quad [3.1]$$

dónde L es la distancia entre la muestra y el detector ($L = 80$ cm), λ es la longitud de onda del haz de electrones a 200 kV ($\lambda = 0.025$ Å) y R el radio de los anillos de difracción. Los resultados se muestran en la tabla 3.2.

Todos los picos de difracción detectados pueden atribuirse a la fase cúbica Fe_3O_4 (magnetita) o la fase cúbica $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ³ (maghemita), indicando que la muestra no contiene la fase $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o hidróxidos de hierro²².

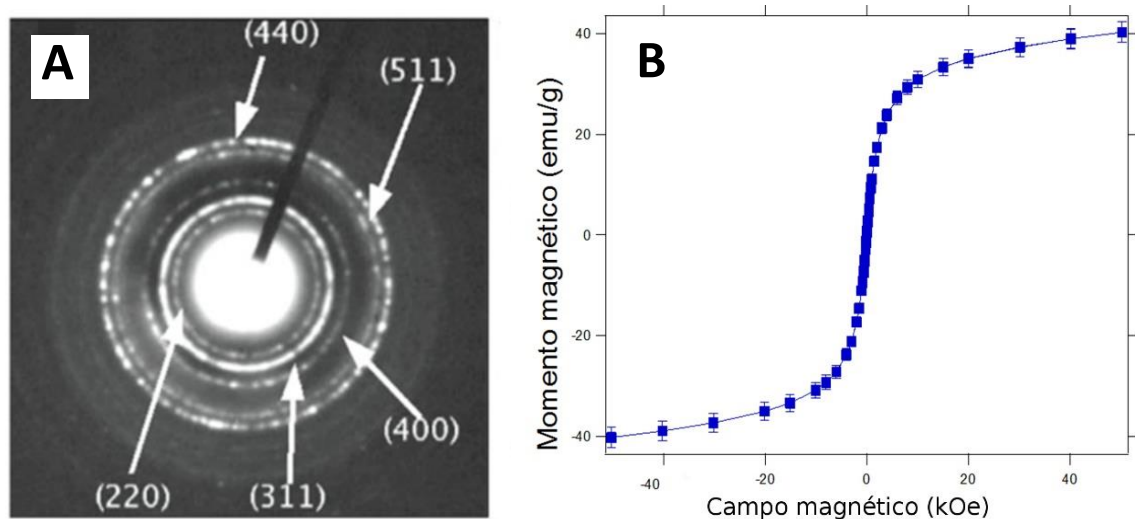


Figura 3.2. (A) Patrón de difracción de los nanocristales magnéticos. (B) Curva de magnetización de los nanocristales magnéticos

Tabla 3.2. Resultados de SAED de las nanopartículas magnéticas

Radio (mm)	6.75	7.90	9.50	11.75	12.35	13.45
d ED (Å)	2.96	2.53	2.10	1.70	1.62	1.48
d Fe ₃ O ₄ (Å)	2.96	2.53	2.12	1.71	1.62	1.48
Plano cristalino (hkl)	220	311	400	422	511	440

El parámetro de red calculado a partir del patrón de difracción fue 8.393 ± 0.03 Å. Los parámetros de red para la maghemita y la magnetita son 8.351 Å^{21} y 8.396 Å^{23} , respectivamente, por lo que la fase cristalina de las nanopartículas se identificaron como Fe₃O₄ ²⁴. Los estudios adicionales de magnetización llevados a cabo con SQUID confirmaron que las nanopartículas son superparamagnéticas (Figura 3.2(B)). El nivel máximo de saturación fue de 40 emu/g, que es típico para nanopartículas magnéticas con tamaños cercanos a 7 nm.

3.3-2. Caracterización del sistema PCL@Fe₃O₄

La modificación de superficie de las nanopartículas magnéticas con ácido cítrico y la polimerización con ϵ -caprolactona, se siguió mediante FTIR (Figura 3.3). La comparación entre los espectros de FTIR obtenidos de las nanopartículas de Fe₃O₄ netas [Figura 3.3(A)] y las modificadas con ácido cítrico mostrados en la [Figura 3.3(B)], indican que el ácido cítrico se incorporó en la superficie de las nanopartículas. Se confirma por la aparición en el espectro de las nanopartículas magnéticas modificadas de dos fuertes bandas de absorción a 1618 y 1400 cm⁻¹, los cuales pueden asignarse a la vibración simétrica y asimétrica de los grupos carboxilato complejados con el Fe de la superficie de la magnetita^{25,26}. La unión del ácido cítrico en la superficie de las nanopartículas magnéticas permite la incorporación de más grupos hidroxilo los cuales sirvieron como punto de inicio para la polimerización de la ϵ -caprolactona. La polimerización en la superficie de las nanopartículas magnéticas se confirmó por la presencia de una fuerte banda a 1733 cm⁻¹ [Figura 3.3(C)], la cual es representativa del estiramiento C=O del carbonilo de estos poliésteres²⁷.

En la Figura 3.4 hay evidencias posteriores de que la policaprolactona se ancló a las nanopartículas magnéticas. Se puede ver una dispersión de nanopartículas PCL@Fe₃O₄ en una solución de THF con Tween 80 que se añadió gota a gota sobre 5 mL de agua mili-Q dando como resultado una dispersión naranja homogénea (Figura 3.4-A) que responde a un campo magnético de 0.4 T dispuesto en el lateral del bote (Figura 3.4-B).

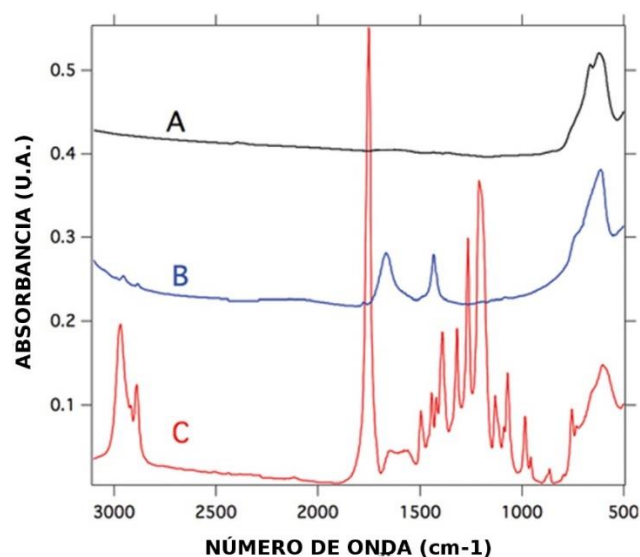


Figura 3.3. Espectro de FTIR de las nanopartículas magnéticas (A), recubiertas con ácido cítrico (B) y tras la polimerización de PCL en su superficie (C)

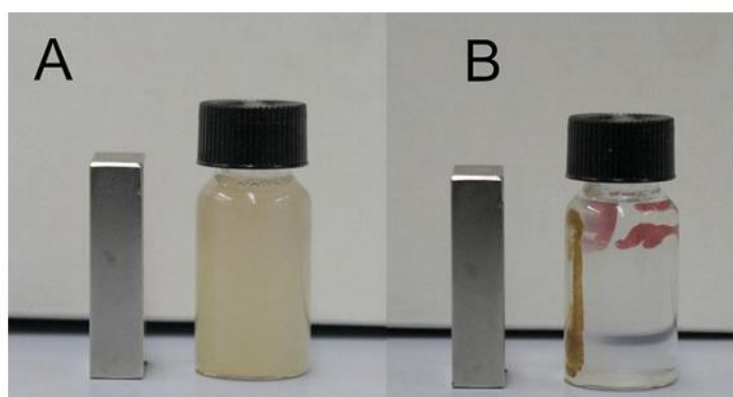


Figura 3.4. Dispersión acuosa de nanopartículas de PCL@Fe₃O₄ en presencia de un campo magnético de 0.4 T. (A) Justo después de colocar el imán y (B) dos minutos más tarde.

Cuando se estudian estas partículas con TEM, se observa que la dispersión coloidal de las partículas híbridas que forman, presentan distinta estructura en función de la cantidad de polímero anclado a las nanopartículas. La Figura 3.5 muestra

fotografías de TEM de partículas híbridas preparadas desde nanopartículas magnéticas con distintas cantidades de PCL ancladas sobre ellas.

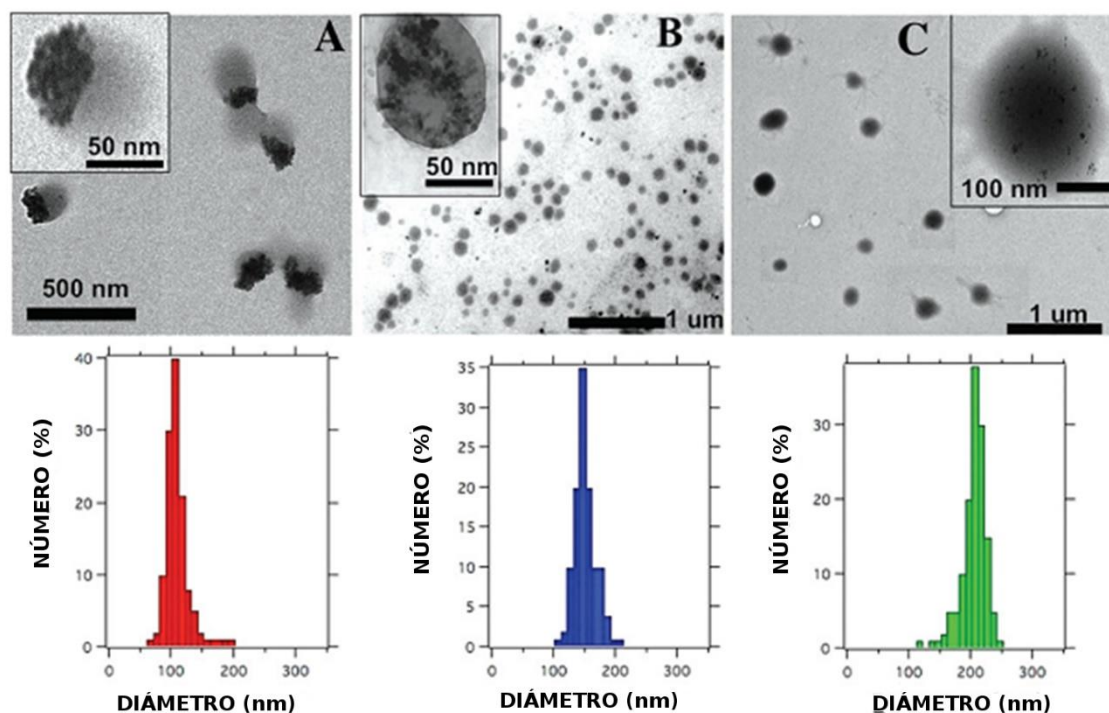


Figura 3.5. Arriba, fotografías de TEM de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cantidades de polímero crecientes: PCL@MN3 (A), PCL@MN4 (B), PCL@MN5 (C). Abajo, respectivos gráficos de tamaño obtenidos por DLS.

Como se puede observar, en función de la muestra usada para preparar las micropartículas híbridas, se obtiene distinta decoración en las partículas. Por ejemplo, cuando se usan las partículas con 20% de policaprolactona ancladas en ellas, la dispersión en agua de este material dio como resultado partículas con cristales magnéticos localizados en el polo formando un cluster. En cambio, el incremento en contenido de PCL en las nanopartículas magnéticas, conduce a la formación de micropartículas híbridas donde las nanopartículas magnéticas se encuentran atrapadas y distribuidas aleatoriamente dentro de las micropartículas. Un efecto concomitante con

el incremento del contenido de PCL es la disgregación de las nanopartículas magnéticas que están atrapadas dentro de las micropartículas. Además, el aumento del contenido de polímero conduce a un incremento del tamaño de las micropartículas finales. De hecho, el tamaño de las micropartículas varía de 110 a 210 nm cuando la cantidad de polímero anclado en las nanopartículas magnéticas se incrementa del 20 al 42%. Para experimentos posteriores, se eligieron las micropartículas híbridas con 30% de PCL porque presentaron la mejor estabilidad coloidal y el mayor contenido de nanopartículas magnéticas para asegurar una buena respuesta magnética.

Se ensayaron estas micropartículas como transportadores de principios activos sensibles a estímulos. El bajo punto de fusión de la matriz de PCL permite cambiar el sistema de sólido a líquido a bajas temperaturas. Esta transición podría variar considerablemente el coeficiente de difusión del principio activo atrapado siendo mayor en la matriz del líquido. De hecho, la difusión de moléculas dentro de un sólido está gobernada por la expresión:

$$D = D_0 e^{-Q/RT} \quad [3.2]$$

dónde D es el coeficiente de difusión, D_0 es el coeficiente de difusión máximo, Q describe la energía requerida para crear un agujero en la matriz por el cual la molécula se mueva, R es la constante de los gases y T es la temperatura. En cambio, la difusión en un polímero fundido puede expresarse con la ecuación de Einstein-Stokes:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_i} \quad [3.3]$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad del medio y r_i es el radio hidrodinámico de la molécula. Así, la transición de la matriz del polímero de estado sólido a fundido aceleraría la liberación del principio activo porque el coeficiente de difusión de una sustancia dada puede incrementarse hasta cinco órdenes de magnitud en tal proceso. Además, si la transición se lanza por un campo magnético externo, se podría modular la liberación del principio activo²⁸. Con esta idea en mente, se determinó el punto de fusión de la capa de polímero en las micropartículas. La calorimetría de barrido diferencial, cuya representación se muestra en la Figura 3.6, nos indicó que el punto de fusión de la capa de policaprolactona es de 47 °C.

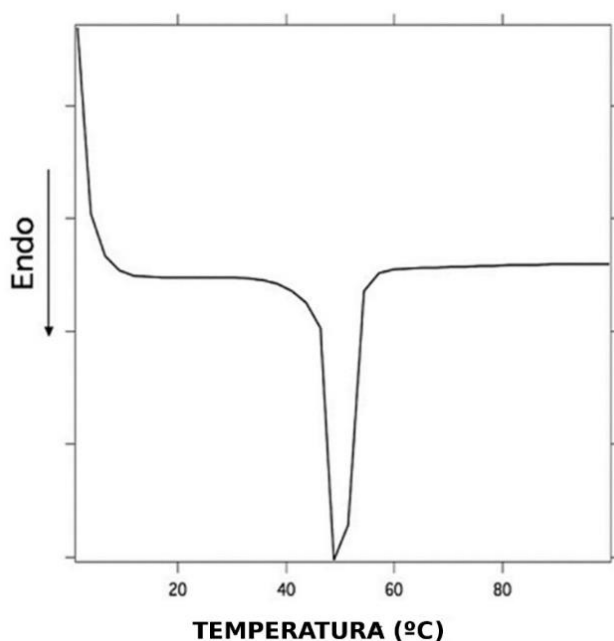


Figura 3.6. Curva de calorimetría de barrido diferencial de micropartículas de PCL@Fe₃O₄.

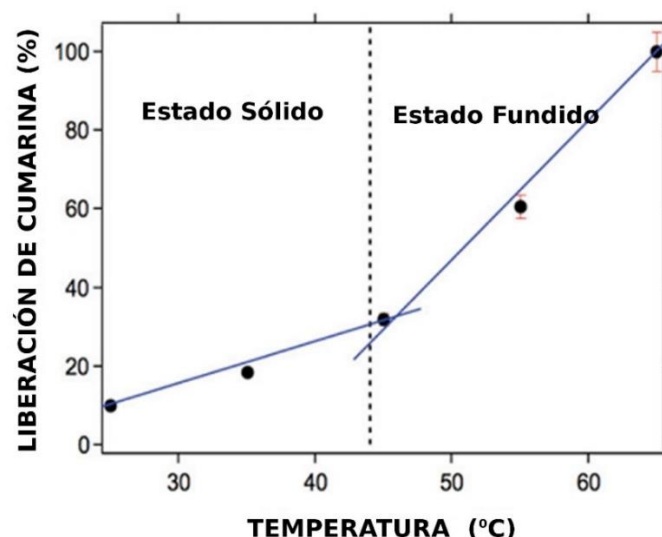


Figura 3.7. Dependencia de la temperatura de la liberación de la cumarina de las micropartículas PCL@Fe₃O₄. Los puntos se han normalizado al nivel máximo de liberación de cumarina en el experimento. Las líneas azules corresponden con el ajuste lineal por debajo y por encima del punto de fusión de la PCL.

Se pusieron en un incubador durante 10 minutos distintas muestras de micropartículas magnéticas híbridas conteniendo cumarina, a distintas temperaturas para investigar la adecuación del sistema para liberar principios activos por encima del punto de fusión del polímero. En la Figura 3.7 se observan los resultados, que presentaron un cambio claro en la cinética de liberación cuando la temperatura se incrementa por encima de 45 °C. Como se esperaba, la liberación de cumarina se dispara por encima del punto de fusión de la policaprolatona, indicando el efecto de transición de fase del polímero en la liberación del principio activo desde las micropartículas.

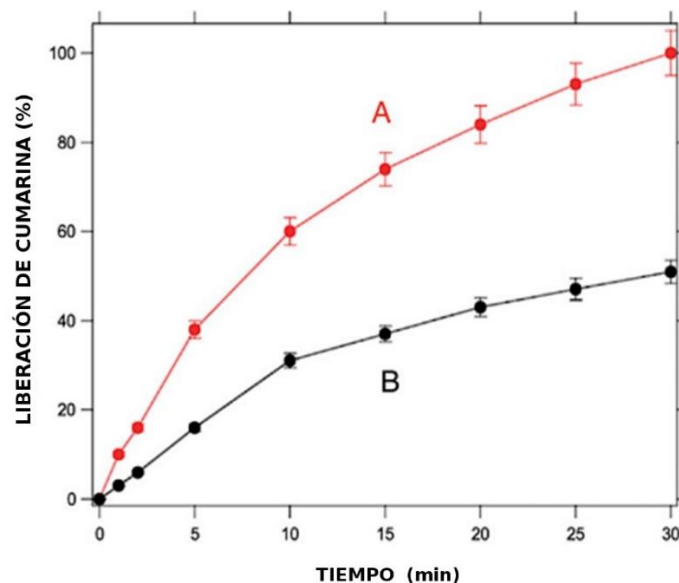


Figura 3.8. Curva de liberación de cumarina desde las micropartículas: (A) bajo la presencia de un campo magnético alterno de 16 kA·m⁻¹ y 100 kHz; y (B) en ausencia del campo magnético alterno.

La presencia de nanopartículas magnéticas dentro de las micropartículas híbridas abre la posibilidad de inducir hipertermia y fundir el polímero, por exposición de las partículas a un campo magnético alternante^{29,30}. Para probar este concepto se sometieron micropartículas cargadas con cumarina a un campo magnético alterno de 16 kA·m⁻¹ y 100 kHz. La Figura 3.8 nos muestra la liberación de cumarina en función del tiempo en la presencia y ausencia del campo magnético. Se puede ver que el uso de un campo magnético alterno puede incrementar la liberación del principio activo alrededor de dos veces. Este resultado parece indicar que el calor generado por las nanopartículas magnéticas es capaz de fundir el polímero de alrededor del núcleo magnético del sistema acelerando la liberación de la cumarina. En estos experimentos la dispersión de micropartículas magnéticas alcanzó temperaturas de hipertermia (43 – 47 °C) bajo el campo magnético alterno. Esta característica puede ser usada por sí misma como

tratamiento coadyuvante para destruir células tumorales o de las que se precise su destrucción.

Otra posible utilidad de las nanopartículas magnéticas es que pueden provocar inhomogeneidades en el campo magnético que podrían servir para marcar la posición del material híbrido dentro el cuerpo por medio de Resonancia Magnética de Imagen. Con el objetivo de probar esta aplicación del sistema sintetizado, se midió la relaxividad y los resultados para r_1 y r_2 fueron de 3.8 y 136 $\text{Fe mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Estos valores son similares a valores previamente publicados para partículas de tamaño similar y a los obtenidos con agentes comerciales^{31,32}. Posteriormente, una dispersión de partículas magnéticas se administró por vía intravenosa a ratas y se tomaron imágenes de resonancia magnética T_2 -pesada. Los experimentos de resonancia magnética de imagen, llevados a cabo antes y después de la inyección en ratas, mostraron un claro descenso en la señal del hígado tras 5 minutos de administrar las micropartículas.

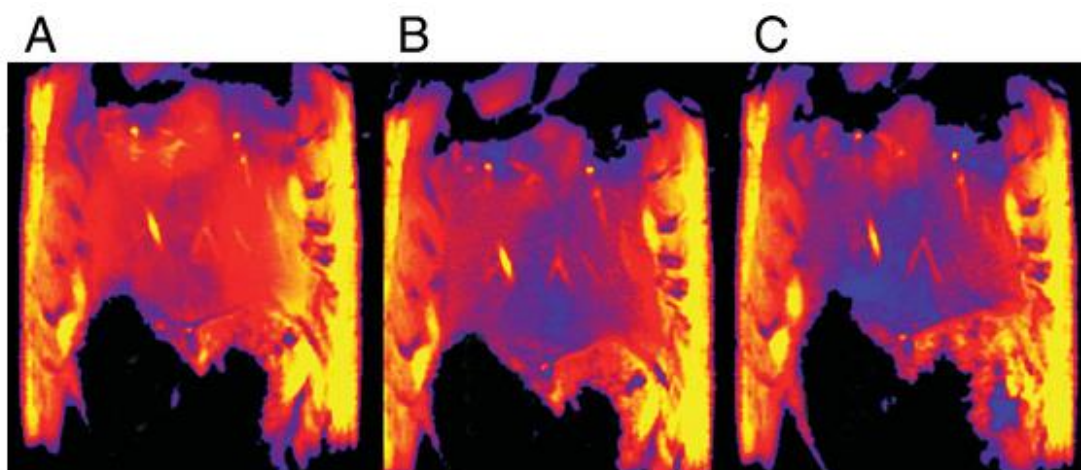


Figura 3.9. Fotografías de resonancia magnética de imagen de un plano del hígado de la rata tomadas a: (A) minuto 0 post inyección, (B) 5 minutos y (C) 60 minutos. El color azulado en el centro de cada imagen muestra la acumulación de las micropartículas.

En la Figura 3.9 se puede observar el cambio de contraste en el hígado que aparece en las imágenes abdominales, antes de la inyección y algunos minutos tras la misma, de las micropartículas. Posteriormente, los experimentos permitieron también observar que las micropartículas son tomadas por el hígado tras 60 minutos de la inyección, resultando en un incremento del color azul en esta región. Estos experimentos *in vivo* ilustran que las partículas magnéticas tienen además propiedades interesantes para resonancia magnética de imagen ya que esta técnica permite un seguimiento del sistema híbrido dentro del tejido hepático en tiempo real.

3.4- CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En este capítulo se presenta la síntesis de nanopartículas biocompatibles de PCL@Fe₃O₄. Este material híbrido se usó para producir por la técnica de precipitación, micropartículas magnéticas con un diámetro hidrodinámico medio de 137 nm. Las micropartículas se usaron como sistema de liberación inteligente de cumarina debido a que fueron capaces de incrementar la liberación de este principio activo tras su exposición a un campo magnético alternante externo. Además, las nanopartículas magnéticas introducen inhomogeneidades magnéticas en el sistema, lo cual se puede detectar por RMI. Esta característica permite el seguimiento de las partículas dentro del cuerpo. El sistema propuesto se podría usar para liberar principios activos en dosis a demanda, como respuesta a un campo magnético externo tras asegurarse de la presencia de las micropartículas en el tejido diana y mejorando el ratio beneficio-riesgo del tratamiento.

3.5- REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

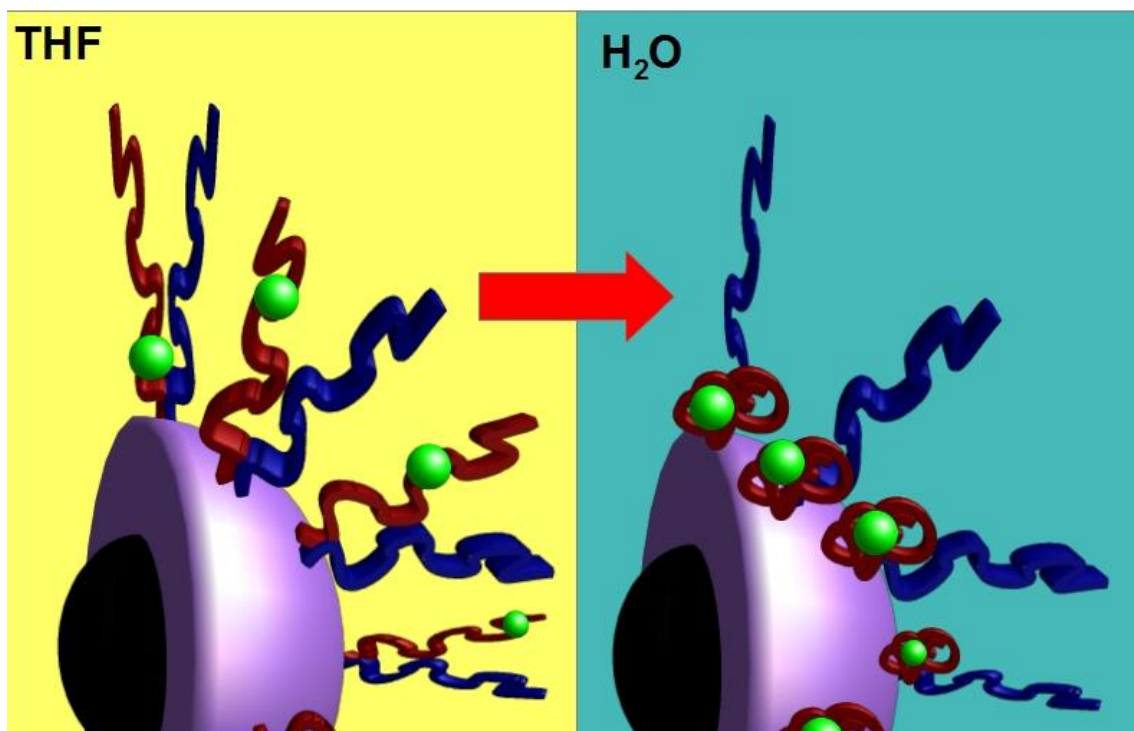
- 1- Sun C, Lee JSH, Zhang M., *Adv Drug Delivery Rev*, 2008; 60, 1252–1265.
- 2- Shi J, Votrubka AR, Farokhzad O, Langer R., *Nano Lett*, 2010;10: 3223–3230.
- 3- Rubio-Retama J, Zafeiropoulos N, Serafinelly C, Rojas-Reyna R, Voit B, Lopez-Cabarcos E, Stamm M. *Langmuir*, 2007;23, 10280–10285.
- 4- Kumar C, editor. Nanotechnologies for the Life Sciences, Vols. 6–10. Wiley-VCH; 2006.
- 5- Chan HM, Zhang L, Tong R, Ghosh D, Gao W, Liao G, Yuet KP, Gray D, Rhee JW, Cheng J, Golomb G, Libby P, Langer R, Farokh-zad OC., *Proc Natl Acad Sci*, 2010;107, 2213–2218.
- 6- Qu H, Caruntu D, Liu H, O'Connor CJ., *Langmuir*, 2011;27, 2271–2278.
- 7- Di Corato R, Bigall NC, Ragusa A, Dorfs D, Genovese A, Marotta R, Manna L, Pellegrino T., *ACS Nano*, 2011; 5, 1109–1121.
- 8- Rachakatla RS, Balivada S, Seo GM, Myers CB, Wang H, Samara-koon TN, Dani R, Pyle M, Kroh FO, Walker B, Leaym X, Koper OB, Chikan V, Bossmann SH, Tamura M, Troyer DL., *ACS Nano*, 2010; 4, 7093–7104.
- 9- Corr SA, Byrne SJ, Tekoriute R, Meledandri CJ, Brougham DF, Lynch M, Kerskens C, O'Dwyer L, Gun'ko JK, *J Am Chem Soc* 2008; 130, 4214–4215.
- 10- Rahimi M, Wadajkar A, Subramanian K, Yousef M, Cui W, Hsieh JT, Nguyen KT. , *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2010; 6, 672–680.
- 11- Asmatulu MA, Zalich RO, Claus JS, Riffle J., *Magn Magn Mater*, 2005; 292, 108–119.
- 12- Derfus AM, Maltzahn GV, Harris TJ, Duza T, Vecchio KS, Ruoslahti E, Bhatia SN., *Adv Mater*, 2007; 19, 3932–3936.
- 13- Gong X, Peng S, Wen W, Sheng P, Li W., *Adv Funct Mater*, 2009;19, 292–297.
- 14- Yin H, Yu S, Casey PS, Chow GM., *Mater Sci Eng C*, 2010; 30, 618–623.
- 15- Liu TY, Hu SH, Liu KH, Shaiu RS, Liu DM, Chen SY., *Langmuir*, 2008;24, 13306–13311.
- 16- Serrano-Ruiz D, Rangou S, Avgeropoulos A, Zafeiropoulos NE, Lopez-Cabarcos E, Rubio-Retama J.; *J Polym Sci Part A: Polym Phys*, 2010;48, 1668–1675.
- 17- Laurenti M, Guardia P, Contreras-Caceres R, Perez-Juste J, Fernandez-Barbero A, Lopez-Cabarcos E, Rubio-Retama J., *Langmuir*, 2011;27, 10484–10491.
- 18- Jiang S, Ji X, An L, Jiang B., *Polymer*, 2001; 42, 3901–3907.

- 19- Schmidt AM., *Macromol Rapid Commun*, 2005;26: 93–97.
- 20- Fraylich M, Wang W, Shakesheff K, Alexander C, Saunders B., *Langmuir*, 2008; 24, 7761–7768.
- 21- Massart R.; *IEEE Trans Magn*, 1981; 17, 1247–1248.
- 22- Yang D, Hu J, Fu S., *J Phys Chem C*, 2009; 113, 7646–7651.
- 23- Yu S, Chow GM., *J Mater Chem*, 2004; 14, 2781–2786.
- 24- Sun S, Zeng H, Robinson D, Raoux S, Rice PM, Wang SX, Li G., *J Am Chem Soc*, 2004; 126, 273–279.
- 25- Todorovsky DS, Dumanova DG, Todorovska RV, Getsova MM., *Croat Chem Acta*, 2002; 75, 155–164.
- 26- Sahoo Y, Goodarzi A, Swihart MT, Ohulchanskyy TY, Kaur N, Furlani EP, Prasad PN., *J Phys Chem B*, 2005; 109, 3879–3885.
- 27- Rusa CC, Tonelli AE. *Macromolecules*, 2000; 33, 5321–5324.
- 28- LaConte LEW, Nitin N, Zurkiya O, Caruntu D, O'Connor CJ, Hu X, Bao G. *J Magn Reson Imaging*, 2007; 26, 1634–1641.
- 29- Bomatí-Miguel O, Morales MP, Tartaj P, Ruiz-Cabello J, Bonville P, Santos M, Zhao X, Veintemillas-Verdaguer S., *Biomaterials*, 2005; 26, 5695–5703.
- 30- Martín-Saavedra FM, Ruiz-Hernández E, Boré A, Arcos D, Vallet-Regí M, Vilaboa, *Acta Biomater*, 2010; 6, 4522–4561.
- 31- Raikher, Y. L.; Shliomis, M. I.; Limiting Viscosity of Ferromagnetic Suspensions in a Strong Magnetic Field. O predel 'Noi Vyazkosti Ferromagnitnykh Suspenzii V Sil'Nom Magnitnom Pole 1974, (4), 41-48.
- 32- Iglesias, O.; Batlle, X.; Labarta, A., *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* 2005, 72, (21), 1-4

RESULTADOS

CAPÍTULO 4

SISTEMA HÍBRIDO BIOCOMPATIBLE



TDC 3. Encapsulación y estabilización en medio acuoso de una molécula hidrofóbica gracias al sistema híbrido.

4.- RESUMEN

“En este capítulo se muestra el desarrollo de un sistema híbrido biocompatible basado en poli(ϵ -caprolactona)-b-poli(etilenglicol) que recubre nanopartículas de $Fe_3O_4@SiO_2$. Estos copolímeros son anclados en la superficie de nanopartículas magnéticas de $Fe_3O_4@SiO_2$ mediante la técnica de “injerto desde” e “injerto hacia”. El resultado es un sistema que puede ser empleado como teranóstico, ya que permiten ser visualizados y seguidos en el interior del organismo mediante técnicas de resonancia magnética de imagen, a la vez que puede servir como vehículo de transporte de principios activos.”

4.1 - INTRODUCCIÓN

Una de las maneras de modificar químicamente las nanopartículas de óxido de hierro es su recubrimiento mediante sílice, la cual va a dar estabilidad coloidal a las partículas y va a servir como soporte de puntos de unión para funcionalizar su superficie con un copolímero dibloque biocompatible adecuado para cargarlo con principios activos poco solubles, y poder así ser útiles en la vehiculización dentro de un organismo vivo. Además, el núcleo de nanopartícula de hierro podría servir como agente de contraste^{1,2,3} para RMI. A su vez, como ya se ha visto, si estos copolímeros biocompatibles son de distinta miscibilidad, se obtendría un nuevo sistema híbrido anfifílico biocompatible, ampliando las posibilidades de uso.

Con este fin se ha preparado un sistema híbrido con un núcleo de una sola nanopartícula magnética⁴, una cubierta de sílice⁵ que a su vez sirve de soporte para funcionalizar⁶ con polímeros biocompatibles capaces de atrapar y transportar principios activos lipófilos en las cadenas poliméricas, a la vez que el sistema queda estabilizado en soluciones acuosas mediante las cadenas poliméricas hidrofílicas. Para ello se han utilizado nanopartículas superparamagnéticas sintetizadas mediante descomposición térmica empleando el método descrito por Hyeon^{7,8,9}. Esta síntesis permite obtener nanopartículas muy monodispersas de 7 nm de tamaño. Esta gran monodispersidad permite un crecimiento idóneo de sílice a su alrededor pudiéndose obtener una corteza de grosor controlado y comprendido entre 5 y 50 nm de diámetro. Esta corteza se ha funcionalizado con glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPS) con el fin de obtener grupos epoxi en su superficie sobre los que poder anclar polímeros o iniciar la polimerización de los mismos. Por un lado se usó metoxi-polietilenglicol (met-PEG) modificado con un grupo carboxílico terminal, que es el que se encarga de abrir el anillo de epoxi del GPS dejando libre, por un lado un grupo hidroxilo y por otro la cadena de met-PEG anclada covalentemente a la superficie del sistema. Este grupo hidroxilo libre que resulta de la apertura del grupo epoxi, se usó para realizar la polimerización de ϵ -caprolactona, de manera que ésta crece en este otro extremo obteniendo finalmente un sistema híbrido compuesto por: un núcleo de nanopartícula magnética, una corteza de sílice y un recubrimiento anfifílico de metoxi-polietilenglicol y policaprolactona (PCL).

4.2- MATERIALES Y MÉTODOS

4.2-1. Materiales

El precursor de cloruro de hierro FeCl_3 y el anhídrido succínico se obtuvieron de Panreac. El ácido oleico, octadeceno, tetraetil ortosilicato (TEOS), IGEPAL co-520, glicidoxi propil trimetoxi silano (GPS), y disolventes utilizados, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El metoxi-polietilenglicol (met-PEG) y ϵ -caprolactona (PCL) se obtuvieron de Fluka. Todos los productos se utilizaron si purificaciones previas.

4.2-2. Métodos

Los métodos utilizados en este trabajo están descritos en los apartados 2.2.2 y 3.2.1. Además, el tamaño y morfología se determinó con un microscopio de barrido JEOL JSM 6335F. Se registraron fotografías con una ampliación entre x1500 y x60000.

Síntesis de las nanopartículas magnéticas

Para la síntesis de las nanopartículas magnéticas se decidió utilizar el método de descomposición térmica llevado a cabo por el método de Hyeon^{7,8}.

1- Primer paso: Preparación del oleato férrico.

12,53 g de ácido oleico (44 mmol) se añaden sobre una solución de 1,6 g de NaOH en 40 mL de agua y 60 mL de etanol. Manteniendo agitación, se añaden 3.604 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (13 mmol) disueltos en 20 mL de agua. Posteriormente se añaden 120 mL de Hexano. Se pone el sistema a reflujo durante 4 horas y luego se limpia con 20 mL de agua tres veces. Se recoge la fase orgánica y se seca a rotavapor.

2- Segundo paso: Descomposición térmica.

7g de octadeceno (8.8 mL / 27 mmol) se añaden a un reactor. Se deja a vacío y a 120 °C durante 1 hora. Se añaden 1,26 g de oleato férrico (1.4 mmol) sintetizado previamente, se mezcla bien, se purga con nitrógeno y se aumenta la temperatura hasta que se llega a reflujo a los 306 °C. A partir de entonces se mantiene durante 40 minutos.

Una vez acabado, se lava con acetona tres veces centrifugando a 8500 rpm 15 minutos, y el precipitado se redispersa en hexano. Al final se obtiene una solución de nanopartículas magnéticas muy homogéneas y monodispersas gracias al pequeño recubrimiento que le da el oleato.

Recubrimiento con sílice

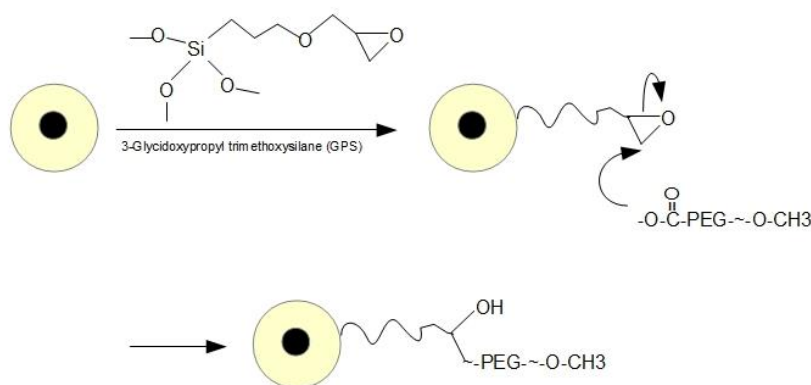
El recubrimiento de sílice se hizo mediante una reacción en microemulsión en la que se produce un intercambio de ligando entre las nanopartículas y el precursor de sílice (TEOS). Para ello, se pesaron 240 mg de Igepal y se redisolviéron en 4.5 mL de hexano con sonicación durante cinco minutos. Se añadieron 0.2 mg de las nanopartículas magnéticas sintetizadas anteriormente y se sonicó otros 5 minutos. Posteriormente se añadieron 40 µL de Amonia y 30 µL de TEOS (0.13 mmol), dejando en agitación magnética a 500 rpm durante 12 horas. Tras la síntesis se añadió media pipeta pasteur de metanol y se centrifugó a 8500 rpm 15 minutos, haciendo lavados con THF anhidro y centrifugando durante al menos tres veces. Se dejaron finalmente redispersadas en THF anhidro.

Recubrimiento con GPS

Para iniciar la polimerización en la superficie de las nanopartículas de sílice@Fe₃O₄ se recubrieron las partículas con GPS^{10,11}. Para ello, a la síntesis anterior de nanopartículas magnéticas con sílice, se le añadieron 0,5 mL de GPS (2.1 mmol), se llevó hasta 5 mL con THF anhidro y se puso a reflujo. Se mantuvo en agitación magnética a 500 rpm durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó a 8500 rpm 15 min y se lavó centrifugando con THF durante al menos tres veces. El precipitado se redispersó en THF.

Unión del met-PEG vía “injerto hacia”

Como polímero hidrofílico se escogió metoxi-polietilenglicol. Su extremo metilado previene el iniciar posteriormente la polimerización de la ϵ -caprolactona, pero su otro extremo hidroxílico le hace poco nucleófilo. Por ello se procedió a modificar con anhídrido succínico para aumentar dicha nucleofilia y que pueda de esta forma reaccionar con el anillo epoxi generando grupos hidroxilos libres, tal como se muestra en el Esquema 4.1.



Esquema 4.1. Representación de la apertura del anillo epoxi por parte del met-PEG

PREPARACIÓN DEL met-PEG CARBOXILADO (met-PEG-COOH)

Para introducir un grupo carboxílico en el met-PEG^{12,13}, se disolvieron 2 g de met-PEG (1 mmol) en 45 mL de THF anhidro y se puso a reflujo. Por otro lado se disolvieron 0.2 g (2 mmol) de Anhídrido Succínico en 5 mL de THF anhidro. Estos 5ml del anhídrido se añadieron a la solución con el met-PEG y se adicionaron 330 μ L de trietilamina. Se dejó en agitación magnética a 700 rpm durante 48 horas. Finalmente se añadieron 30 mL de HCL 1N. El metoxi-polietilenglicol-succínico (met-PEG-COOH) se aisló realizando un mínimo de tres extracciones con 40 mL de CHCl₃. Se secó posteriormente a rotavapor.

ANCLAJE DEL met-PEG-COOH A LAS NANOPARTÍCULAS

El acoplamiento del met-PEG-COOH se llevó a cabo siguiendo los trabajos de Stamm y colaboradores^{14,15}. La solución resultante anterior de nanopartículas magnéticas recubiertas de silicio y funcionalizadas con GPS, se llevó hasta 5 ml con THF anhidro y se añadieron 3 mL de una solución 0.066 g/mL del met-PEG-COOH (0.095 mmol). Con agitación magnética a 500 rpm se llevó a reflujo y se mantuvo durante 24 horas. Finalmente, se centrifugó a 8500 rpm 15 minutos, y se realizó un mínimo de tres lavados centrifugando con THF anhidro para finalmente redispersar el producto final nanopartículas magnéticas con sílice y met-PEG-COOH (NMSiGCpeg) en THF anhidro.

Polimerización de la ϵ -caprolactona vía “injerto desde”

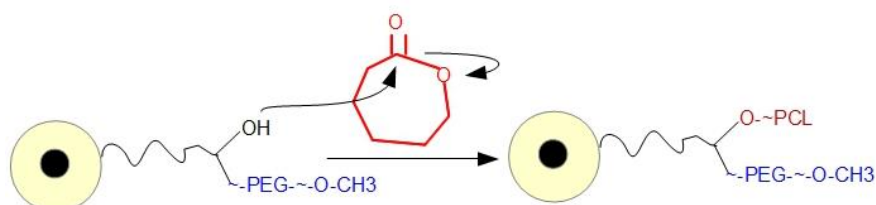
Las partículas NMSiGCpeg sintetizadas previamente, se llevaron hasta 10 mL con THF, y se les añadió 1 mg de trifluorometanosulfonato Sn(II). Posteriormente se

añadieron varias cantidades de ϵ -caprolactona para obtener distintas cantidades de polímero lipofílico en superficie. Estas cantidades pueden verse en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Cantidades de ϵ -caprolactona utilizadas en las síntesis y nomenclatura del sistema completo

ϵ -caprolactona (mmol)	0.0035 mmol	0.007 mmol	0.014 mmol	0.028 mmol
Nomenclatura	NMSiGCpegCl1	NMSiGCpegCl2	NMSiGCpegCl3	NMSiGCpegCl4

El reactor se llevó hasta 60 °C con reflujo y se añadió la ϵ -caprolactona. Se mantuvo con agitación magnética a 500 rpm durante 24 horas. Tras este tiempo, se realizaron un mínimo de tres lavados con THF anhidro centrifugando a 8500 rpm 15 minutos. Se obtuvo al final el sistema híbrido NMSiGCpeg con policaprolactona (NMSiGCpegCl). El Esquema 4.2 ilustra la polimerización de ϵ -caprolactona por el método de apertura de anillo.



Esquema 4.2. Polimerización por apertura de anillo iniciada por los hidroxilos libres del grupo GPS

Carga del sistema con una molécula hidrofóbica

Para comprobar la funcionalidad del sistema a la hora de utilizarse como transportador y estabilizador en medios acuosos de moléculas lipofílicas, el sistema

híbrido se cargó con una sustancia hidrofóbica fluorescente y se puso a prueba en un medio acuoso. Esta sustancia es “2-amino-4,6-difenilbenzoato de etilo” (ADE) (Ver Figura 4.1), precursor de carbazoles²⁰, interesantes en la química de antitumorales²¹ y con una solubilidad $\approx 0.35 \mu\text{g/mL}$. Para ello se dispersó una alícuota de 1 mL (2 mg/ml) del sistema híbrido basado en NMSiGCpegCl2 en 2 mL de THF. Posteriormente se añadieron 0.2 mg de sustancia hidrofóbica ADE dejando sonicar durante 5 minutos y agitando manualmente en el sonicador. A la solución resultante se le añadieron 6 mL de agua miliQ y se sonicó agitando manualmente durante otros 5 minutos. El sistema se dejó durante 12 horas en precipitación magnética con un imán de 0.4 T.

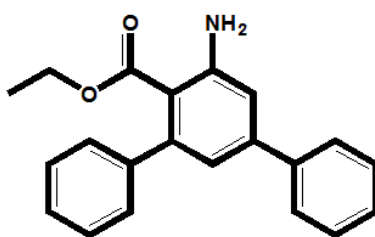
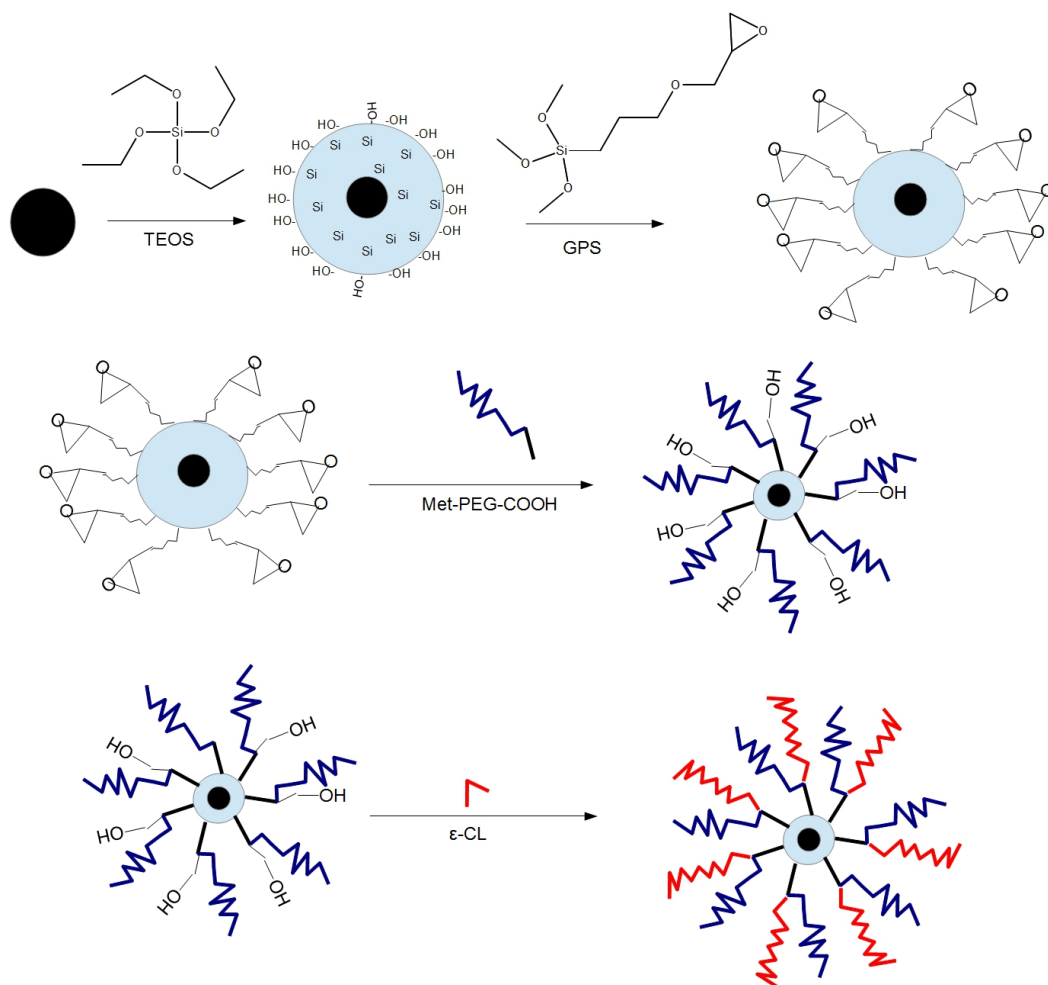


Figura 4.1. Fórmula del 2-amino-4,6-difenilbenzoato de etilo.

4.3- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tras la síntesis, se obtiene un sistema híbrido de nanopartículas de hierro recubiertas de sílice con unos pelos poliméricos en su superficie con miscibilidad selectiva. La síntesis de todo el sistema queda resumida en el Esquema 4.3.



Esquema 4.3. Representación esquemática de los pasos progresivos de funcionalización de las nanopartículas magnéticas con corteza de sílice.

4.3-1. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

Usando TEM se pudo estudiar la forma y cristalinidad de las partículas sintetizadas. Como se observa en la Figura 4.2, se obtuvieron nanopartículas monodispersas de un tamaño medio de 7 nm. El análisis de difracción (SAED) permitió determinar el espaciado de los planos, que junto con el ángulo y los índices de Miller (h,k,l) permitió calcular el tamaño de la celdilla unidad, a través de la ecuación [4.1]:

$$d = \frac{a}{\sqrt{h^2+k^2+l^2}} \quad [4.1]$$

Los resultados quedan reflejados en la Tabla 4.2.

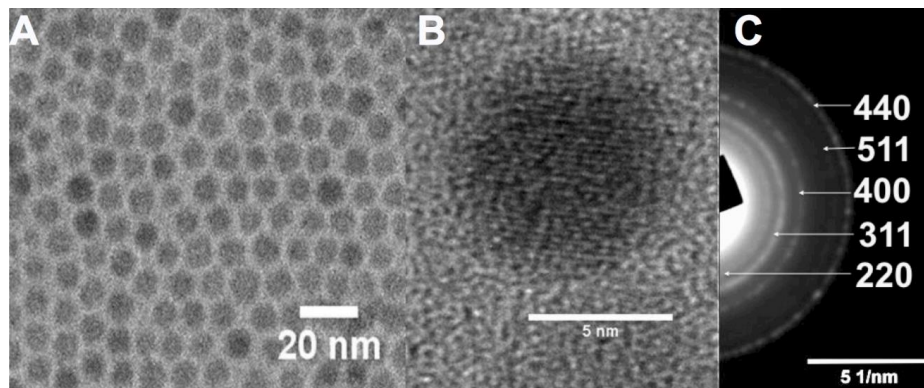


Figura 4.2. Fotografía de TEM. A, nanopartículas de óxido de hierro; B, detalle de una de las nanopartículas viéndose los planos cristalinos; C, diagrama de difracción con los índices de Miller.

Tabla 2. Espaciado de red, índice de Miller y dimensión de la celdilla unidad

d (Å)	6.50	5.85	4.61	3.76	3.17
(hkl)	(220)	(311)	(400)	(511)	(440)
a (celdilla unidad) (Å)	8.90	8.82	8.68	8.81	8.70

De acuerdo con estos resultados, la celdilla unidad de las nanopartículas de óxido de hierro obtenidas sería de 8.391 Å, valor que se acerca más al que corresponde con la fase cristalina de Fe₃O₄ magnetita (8.396 Å) que a γFe₂O₃ maghemita (8.351 Å)¹⁷.

4.3-2. Caracterización de las nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice y funcionalizadas

Tras el recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con sílice y posterior funcionalización, estas fueron estudiadas por TEM observando cambios en su superficie en función del polímero y cantidades de policaprolactona que se fueron polimerizando en su superficie. En la Figura 4.3 vemos una fotografía de TEM de las nanopartículas magnéticas con la cubierta de sílice. Se puede observar el tamaño esférico, la monodispersidad y la inclusión de un solo núcleo de nanopartículas en el interior del sistema. Las partículas presentan un tamaño medio de 48 nm. Observando la fotografía de microscopía de transmisión tras el recubrimiento con met-PEG-COOH, se puede apreciar un velo de polímero alrededor de las partículas.

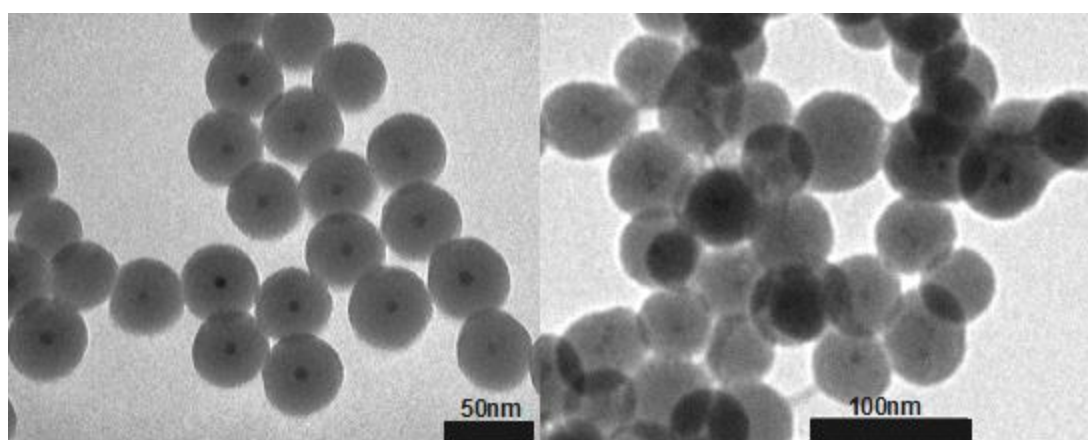


Figura 4.3. Izquierda, fotografía de nanopartículas magnéticas con sílice. Derecha, nanopartículas magnéticas con sílice y met-PEG-COOH.

Tras la funcionalización con met-PEG-COOH se fueron añadiendo distintas cantidades de ϵ -caprolactona. En el estudio de dichas partículas por TEM se pudieron observar diferencias significativas según se aumentaba la cantidad de policaprolactona

utilizada en la síntesis de polimerización. La Figura 4.4 muestra las micrografías de las partículas sintetizadas empleando diferentes cantidades de ϵ -caprolactona.

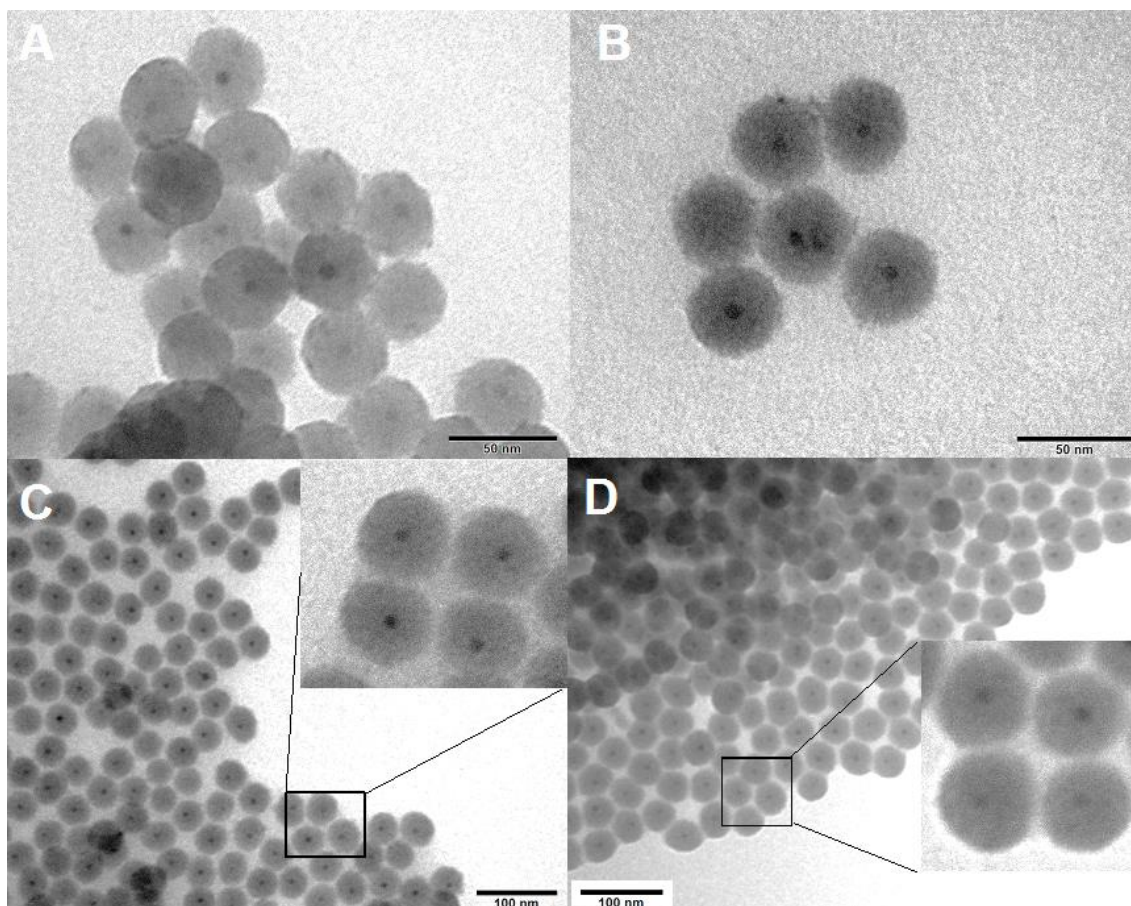


Figura 4.4: Fotografías del sistema con distintas cantidades de policaprolactona; A, NMSiGCpegCl1; B, NMSiGCpegCl2; C, NMSiGCpegCl3 y D, NMSiGCpegCl4

Uno de los primeros resultados que se pueden ver en la Figura 4.4 es la variación en la superficie de las partículas como resultado de la polimerización en la superficie, de tal forma que a medida que aumentaba la cantidad de ϵ -caprolactona, podemos observar un incremento en la cantidad de polímero existente en la superficie. Además como resultado del incremento en la cantidad de polímero, se puede observar en las figuras, cómo la morfología de la superficie varía. Así por ejemplo en la Figura 4.4 (A y B) se puede ver que la superficie se ha vuelto rugosa, pudiéndose observar la presencia

de pequeñas regiones o dominios diferenciados en la superficie de las partículas. En contraste a esto, en las Figuras 4.4 (C y D) se puede observar cómo las partículas están recubiertas por una capa de polímero que crea una estructura homogénea.

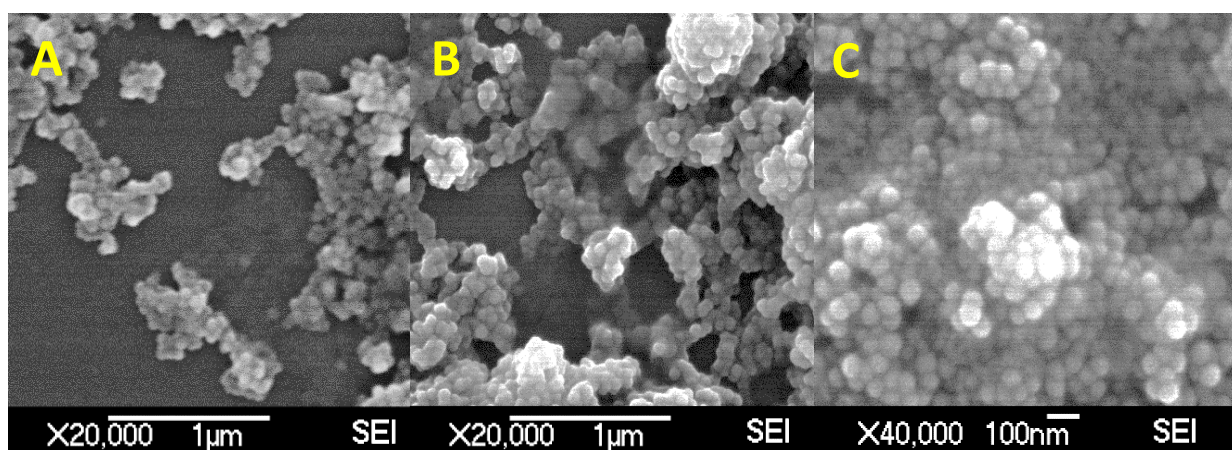


Figura 4.5. Fotografías de SEM de los sistemas A, NMSiGCpegCl1; B, NMSiGCpegCl2 y C, NMSiGCpegCl3

La Figura 4.5 muestra fotografías de SEM donde puede observarse cómo va aumentando la cantidad de polímero en superficie. En la Figura 4.5(A) se pueden ver las nanopartículas NMSiGCpegCl1 en agregados más o menos aislados, pero al aumentar la cantidad de PCL en superficie, como es el caso de las Figuras 4.5(B y C), los agregados debidos al polímero aumentan hasta formar una amalgama de partículas tal y como ya habíamos observado en las fotografías de la Figura 4.4.

Con el fin de conocer los efectos de la síntesis en el diámetro hidrodinámico de las partículas se realizaron medidas de dispersión de correlación fotónica de todas las muestras utilizando como solvente THF, ya que éste es buen solvente tanto para la met-

PEG-COOH como para la policaprolactona, por lo que puede permitir que las cadenas de ambos polímeros queden extendidas.

Se midieron los diámetros hidrodinámicos de las partículas según se iban funcionalizando. El resultado se muestra en la Figura 4.6.

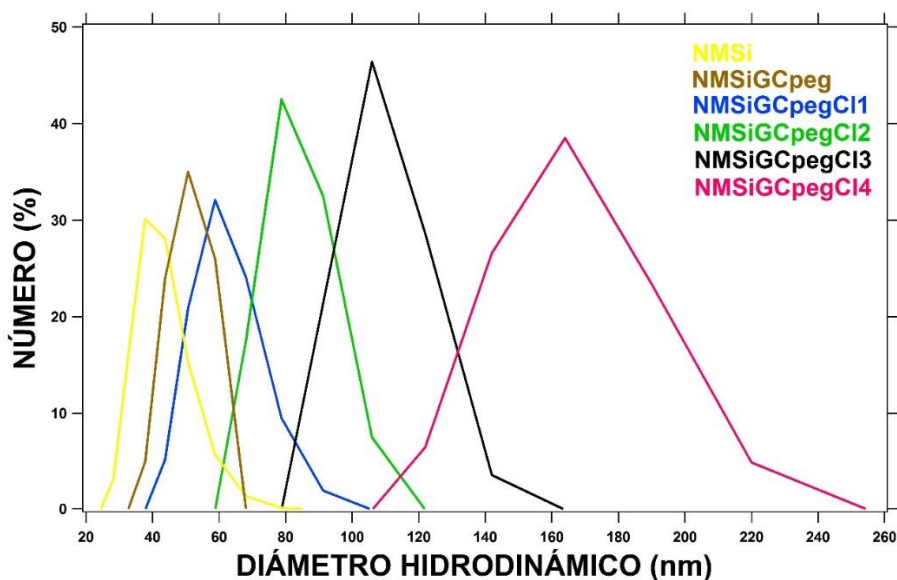


Figura 4.6. Diámetro hidrodinámico de las partículas antes y tras la funcionalización con met-PEG y distintas cantidades de ϵ -caprolactona.

La Figura 4.6 nos muestra el incremento en el tamaño del sistema híbrido; primero, según se funcionaliza con ambos polímeros; y luego según se incrementa la policaprolactona en superficie. Puede observarse cómo las partículas con la mayor cantidad de policaprolactona tiene un tamaño medio de 165 nm y un rango muy amplio de tamaño, lo que nos indica una elevada agregación del sistema, tal y como quedó confirmado mediante microscopía de transmisión y de barrido. Parecido, pero en menor medida, sucede con las partículas NMSiGCpegCl3 donde la alta cantidad de polímero da lugar a agregaciones con un diámetro hidrodinámico medio de 106 nm. Según se

disminuye la cantidad de polímero en superficie se puede observar cómo el diámetro hidrodinámico disminuye, hecho que ya hemos podido ver por medio de TEM y SEM.

La ruta de síntesis fue seguida mediante FTIR. La adición creciente de ϵ -caprolactona también se siguió mediante esta técnica. El seguimiento desde nanopartículas magnéticas hasta el sistema híbrido completo NMSiGCpegCl puede verse en la Figura 4.7.

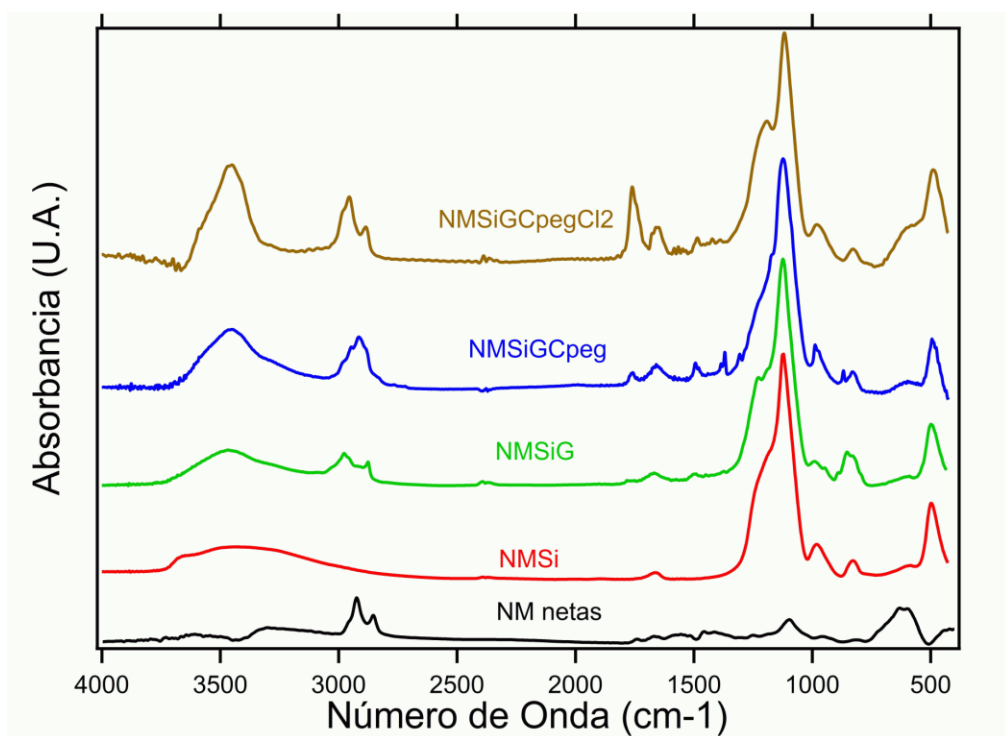


Figura 4.7. Espectros de FTIR de las nanopartículas magnéticas netas (negro), recubiertas de sílice (rojo), funcionalizadas con GPS (verde), tras la unión de met-PEG-COOH (azul) y tras la polimerización de la ϵ -caprolactona (marrón).

Analizando el espectro de infrarrojos (ver Figura 4.8) se puede ver que tras recubrir las nanopartículas magnéticas con sílice, las bandas a 2850 – 2915 cm⁻¹ correspondientes a la extensión del enlace C-H de las cadenas de oleato que recubrían las nanopartículas, desaparecen al quedar enmascaradas por la sílice, y aparecen picos

característicos de la sílice de gran intensidad a 1097, 935, 750 cm^{-1} que se corresponden con la banda de extensión Si-O-Si, extensión asimétrica Si-OH y extensión simétrica Si-O-Si respectivamente¹⁸. Tras la funcionalización con GPS, las bandas de extensión C-H a 2850 – 2915 cm^{-1} vuelven a aparecer debidas a la parte alifática del GPS, junto con un pico a 908 cm^{-1} del grupo epoxi¹⁹. Una vez anclado el met-PEG-COOH se puede apreciar la aparición de una banda a 1733 cm^{-1} debida al estiramiento del grupo C=O del grupo éster. Esta misma banda incrementa su intensidad a medida que se polimeriza la caprolactona y aumenta la cantidad de la misma en superficie.

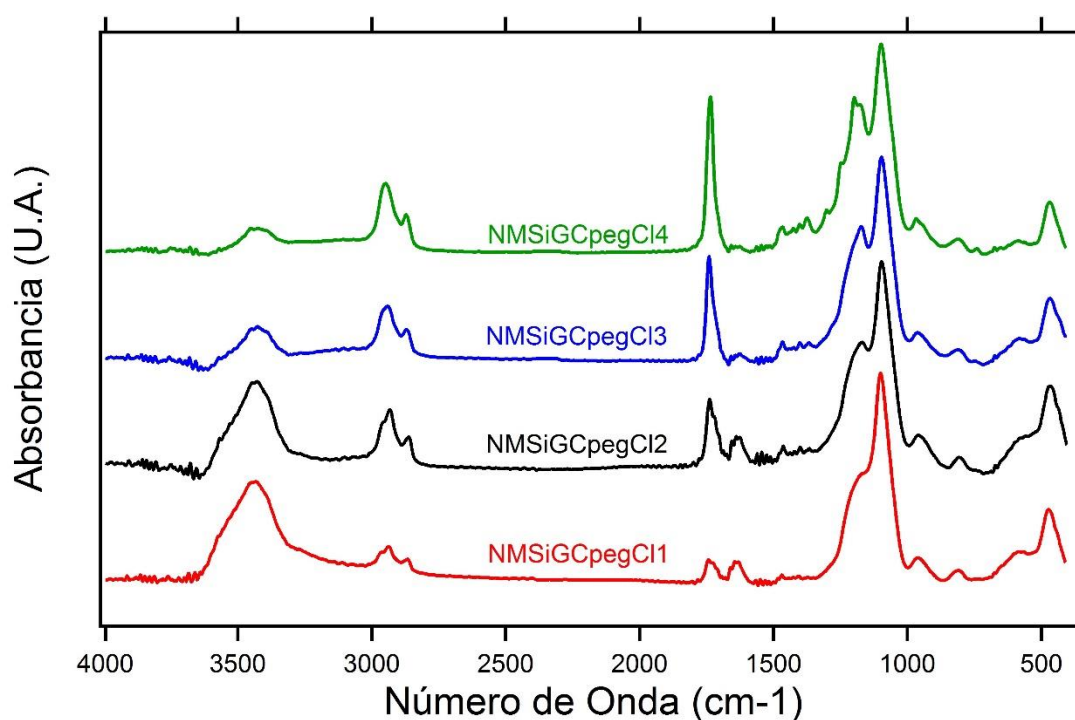


Figura 4.8. Espectros de infrarrojos de NMSGCpeg con cantidades crecientes de ϵ -CL polimerizadas. Sistema NMSGCpegCl1 en rojo; NMSGCpegCl2 en negro; NMSGCpegCl3 en azul y NMSGCpegCl4 en verde

Como se ve en los espectros de la Figura 4.8, según se incrementa la cantidad de ϵ -caprolactona, la señal a 1733 cm^{-1} debida al estiramiento del C=O del grupo éster aumenta en intensidad gradualmente. A su vez, la señal a 1631 cm^{-1} debida al grupo –

OH libre del grupo epoxi previamente abierto por el met-PEG-COOH, disminuye en intensidad según se van ocupando estos hidroxilos en abrir anillos de ϵ -caprolactona para iniciar la polimerización.

4.3-3. Aplicación del sistema

Para comprobar la adecuación del sistema a la hora de su utilidad como solubilizador de sustancias hidrofóbicas, se utilizó 2-amino-4,6-difenilbenzoato de etilo (ADE), una molécula muy hidrofóbica la cual tiene una solubilidad de (0.35 $\mu\text{g/mL}$) y de carácter fluorescente, lo que facilita su visualización directa de forma sencilla mediante una lámpara de luz ultravioleta.

Se realizó una carga inicial de las partículas híbridas con la molécula en THF y posteriormente se le añadió al sistema agua miliQ. Se obtuvo una solución que bajo luz ultravioleta, tenía una tonalidad amarillo-verdosa. Se dejó precipitando magnéticamente durante 12 horas. Los resultados se fotografiaron como se muestra en la Figura 4.9.

La carga de esta molécula se realiza explotando las propiedades hidrofóbicas de las cadenas de policaprolactona. Para ello se dispersaron inicialmente las partículas de NMSiCpegCl₂ en THF junto con la molécula ADE a cargar. Una vez se realizó esta dispersión, se añadió lentamente la dispersión de estas partículas a la solución acuosa. Este hecho cambia la polaridad del solvente produciendo el colapso de las cadenas de policaprolactona y el atrapamiento en su interior de la molécula de ADE. En este proceso,

el met-PEG queda orientado hacia el exterior estabilizando coloidalmente las partículas. La TDC 3 muestra el proceso de encapsulación de la molécula.

Observando las fotografías de la Figura 4.9, se puede ver que tras la aplicación del campo magnético, la solución pasa de una coloración amarillo verdosa a totalmente transparente.

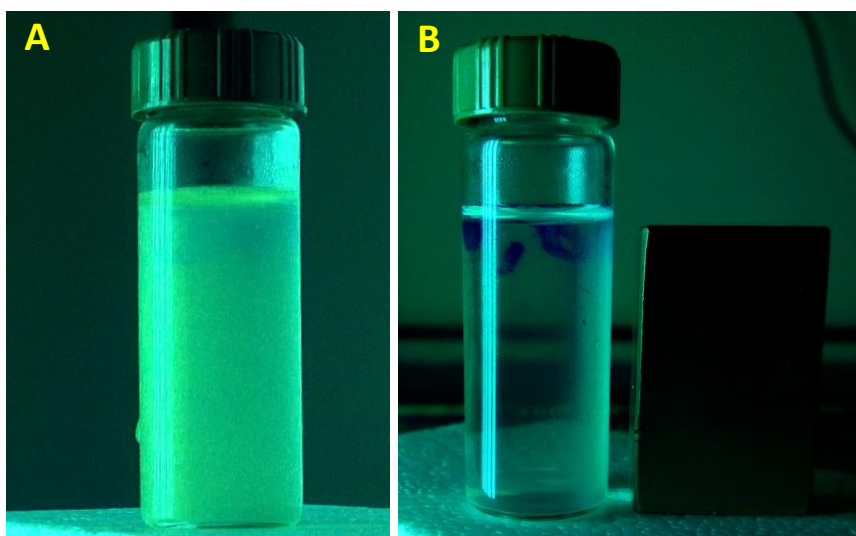


Figura 4.9. Fotografía con fuente de luz ultravioleta de A) sistema híbrido cargado con ADE en medio acuoso, y B) el mismo sistema tras la aplicación de un campo magnético de 0.4 T.

Observando la figura 4.9(A), se puede ver cómo la molécula ADE se encuentra en suspensión junto al sistema híbrido por la coloración amarillento-verdosa que muestra bajo luz ultravioleta. Una vez se aplica un campo magnético por medio de un imán colocado junto al bote, el sistema híbrido responde al campo precipitando en la pared del bote en dirección al campo. Atendiendo a la figura 4.9(B), se puede observar cómo la molécula ADE se ha desplazado junto al sistema híbrido, quedando la solución transparente excepto la zona dónde ha precipitado la molécula, que coincide con la precipitación del sistema híbrido magnético, lo que nos indica que se encontraba

inmovilizada dentro del sistema. Apoyando esto, es conveniente observar el fondo del bote, dónde puede apreciarse que no hay ningún precipitado que indique insolubilización de ADE. Por tanto, el sistema híbrido ha sido capaz de atrapar la molécula permitiendo su solubilización en un medio acuoso y su retirada mediante un campo magnético externo.

4.4- CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Se sintetizaron nanopartículas magnéticas monodispersas de 7 nm de tamaño las cuales se recubrieron con una capa de sílice. Esta cubierta se funcionalizó con un copolímero anfifílico de metoxi-polietilenglicol y distintas cantidades de policaprolactona, ambos polímeros biocompatibles. Tras estudiar el tamaño adecuado de la cadena lipofílica, se introdujo en el sistema híbrido una molécula de ADE muy lipófila que pudo ser solubilizada y estabilizada en un medio acuoso gracias al sistema híbrido y a la estabilización de la cadena hidrofílica de metoxi-polietilenglicol. Esta carga de ADE por parte del sistema híbrido pudo comprobarse gracias a la aplicación de un campo magnético externo al cual eran sensibles, precipitando todo el sistema y la molécula cargada en su interior hacia el campo magnético, quedando transparente el sobrenadante.

4.5- REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

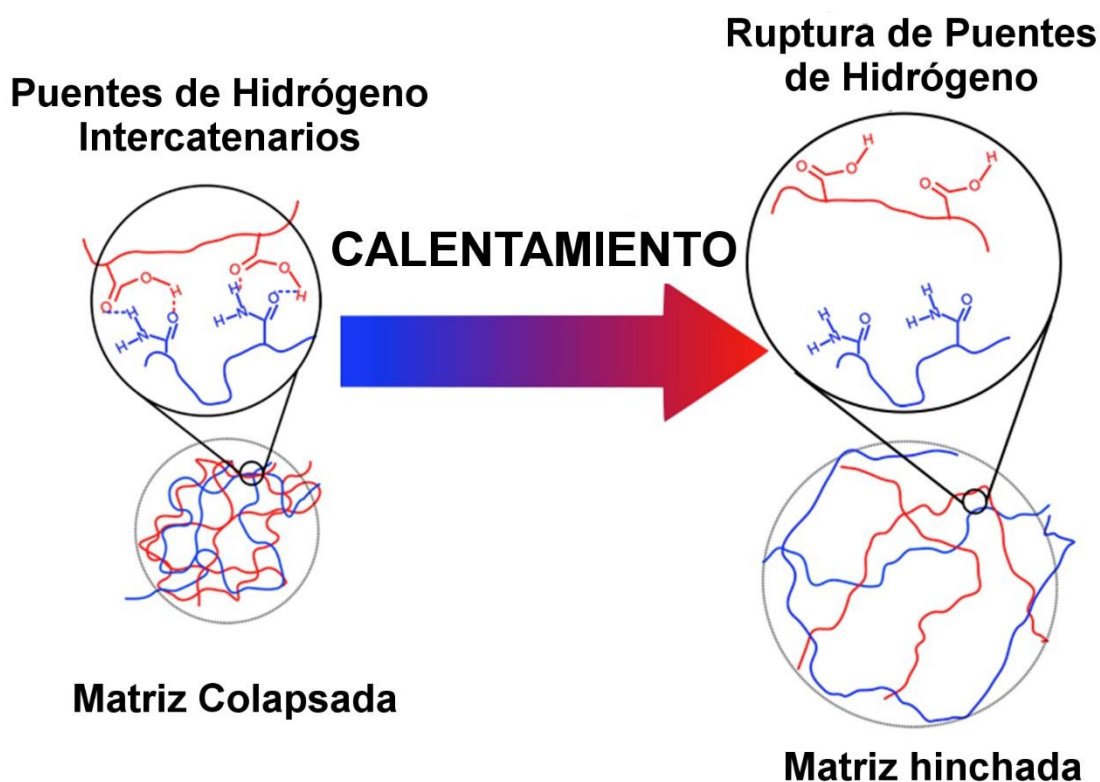
- 1- Nature Reviews Cancer 5, 161-171 (March 2005), Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, Mauro Ferrari.
- 2- Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S., *Adv Mater.* 2010 Jul 6; 22(25), 2729-42.
- 3- Sung-Jin Bae, Ji-Ae Park, Jae-Jun, Gang-Ho Lee, Tae-Jeong Kim, Done-Sik Yoo, Yongmin Chang., *Current Applied Physics* 9, 2009, S19–S21
- 4- Mohammed Ibrahim Shukoor, Filipe Natalio, Helen Annal Therese, Muhammad Nawaz Tahir, Vadim Ksenofontov, Martin Panthöfer, Marc Eberhardt, Patrick Theato, Heinz Christoph Schröder, Werner E. G. Müller, Wolfgang Tremel, *Chem. Mater.*, 2008, 20, 3567–3573
- 5- Yuri A. Barnakov, Minghui H. Yu, Zeev Rosenzweig , *Langmuir*, 2005, 21, 7524-7527
- 6- Yi-Hsin Lien, Tzong-Ming Wu, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, 326, 517-521
- 7- Jongnam Park, Kwangjin An, Yosun Hwang, Je-Geun Park, Han-Jin Noh, Jae-Young Kim, Jae-Hoon Park, Nong-Moon Hwang, Taeghwan Hyeon, *Nature Materials*, 2004, 3, 891 - 895.
- 8- Hyeon T, Lee SS, Park J, Chung Y, Na HB, *J Am Chem Soc.*, 2001, 123(51), 12798-801.
- 9- Shao-Long, T.; Hyeon-Cheol, L.; Youn-Sang, B.; Min-Bae, K.; Kangtaek, L.; Chang-Ha, L.; *Eng. Aspects*, 2007, 293, 278–285.
- 10- L. Chu, M. W. Daniels, L. F. Francis, *Chem. Mater.*, 1997, 9, 2577-2582
- 11- C. Flesch, M. Joubert, E. Bourgeat-Lami, S. Mornet, E. Duguet, C. Delaite, P. Dumas, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2005, 262, 150–157
- 12- Xin-tao Shuai, Zbigniew Jedlinski, Qiang Luo, Nozirow Farhod, *Chinese Journal of Polymer Science*, 2000, Vol. 18, No 1, 19-23
- 13- Jie fu, Jennifer Fiegel, Justin Hanes, *Macromolecules*, 2004, 37, 7174-7180
- 14- Leonid Ionov, Alexander Sidorenko, Klaus-Jochen Eichhorn, Manfred Stamm, *Langmuir*, 2005, 21, 8711-8716.
- 15- Petra Uhlmann, Leonid Ionov, Nikolay Houbenov, Mirko Nitschke, Karina Grundke, Michail Motornovb, Sergiy Minko, Manfred Stamm, *Progress in Organic Coatings*, 2006, 5, 168–174
- 16- Marianne Labet, Wim Thielemans, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 3484–3504
- 17- Serrano-Ruiz D, Rangou S, Avgeropoulos A, Zafeiropoulos N, López-Cabarcos E, Rubio-Retama J, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2010; 48, 1668–1675;

- 18- H. L. Ding, Y. X. Zhang, S. Wang, J. M. Xu, S. C. Xu, G. H. Li; *Chem. Mater.*, 2012, 24, 4572-4580
- 19- Yim, H.; Kent, M. S.; Tallant, D. R.; Garcia, M. J.; Majewski, L, *Langmuir*, 2005, 21, 4382-4392.
- 20- P. Alonso-Cristobal, M. Laurenti, F.J. Sanchez-Muniz, E. López-Cabarcos, J. Rubio-Retama, *Polymer*, 2012, 53, 4569-4578
- 21- Tomoki Takeuchi, Shinya Oishi, Toshiaki Watanabe, Hiroaki Ohno, Jun-ichi Sawada, Kenji Matsuno, Akira Asai, Naoya Asada, Kazuo Kitaoura, Nobutaka Fujii, *J. Med. Chem.* , 2011, 54, 4839–4846

RESULTADOS

CAPÍTULO 5

MICROGELES SEMI- INTERPENETRADOS DE PAAc/PAAm, SISTEMAS TERMOSENSIBLES Y SU DINÁMICA MOLECULAR



TDC 4. Comportamiento del gel interpenetrado tras la aplicación de calor

5.- RESUMEN

“En este capítulo se han sintetizado microgeles constituidos por cadenas de poli(ácido acrílico) (PAAc) y poliacrilamida (PAAm) usando el método de polimerización por emulsión concentrada. Estos microgeles muestran un intenso comportamiento de hinchamiento cuando se calientan que no es comparable con lo que se observa en los microgeles de PAAc netos o los microgeles de PAAm netos. Con el objetivo de entender los cambios microscópicos que ocurren en el microgel, se ha usado dispersión cuasielástica de neutrones (IQNS) y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Con IQNS se ha observado que a 17 °C, la coexistencia de PAAc y PAAm en los microgeles produce una reducción sustancial de los movimientos vibracionales de las cadenas de polímero al igual que una reducción de los coeficientes de difusión de los segmentos de cadena polimérica. En cambio cuando los microgeles se calientan a 57 °C, se observa un incremento de las oscilaciones de la componente vibracional al igual que un incremento significativo de los coeficientes de difusión de los segmentos. Los experimentos de FTIR-ATR indican que durante el calentamiento del microgel, hay una ruptura de puentes de hidrógeno intramoleculares existentes entre los grupos COOH y CONH₂ de las cadenas de polímero vecinas. Este proceso es reversible y estas interacciones reaparecen de nuevo cuando el sistema se enfría a 17 °C, durante el colapso de los microgeles.”

5.1- INTRODUCCIÓN

La síntesis de materiales inteligentes capaces de responder a estímulos externos es uno de los campos más activos en la química de polímeros. Los microgeles se han estudiado mucho en la última década debido a su pequeño tamaño y, contrariamente a lo que sucede con los geles, responden rápidamente a estímulos externos. El fenómeno de transición de volumen del gel en respuesta a un estímulo externo (por ejemplo, temperatura, pH, fuerza iónica, campo eléctrico¹⁻¹²) ha despertado interés en investigar estos microgeles como materiales potenciales en distintas aplicaciones en farmacia¹³. El uso de este tipo de materiales inteligentes para controlar la liberación de principios activos requiere el acoplamiento de un estímulo externo, como pudiera ser la fiebre o un incremento de temperatura local como en el caso de zonas tumorales, que provoque un cambio en la matriz del polímero que dispare la liberación del principio activo. Por ejemplo, a la temperatura corporal de un ser humano, el gel estaría colapsado manteniendo retenido el principio activo en su interior, dentro de su red polimérica, sin embargo, excediendo cierta temperatura, el microgel se hincharía incrementando su tamaño de poro y así permitiendo la liberación de dicha sustancia atrapada.

Hay dos tipos de microgeles sensibles a la temperatura, aquellos que presentan temperatura de solución crítica inferior (LCST) como los geles de poli(n-isopropilacrilamida), los cuales colapsan con el calentamiento¹⁵⁻²⁰; y aquellos que muestran temperatura de solución crítica superior (UCST), que se hinchan en respuesta al incremento de temperatura. Las redes interpenetradas de polímero basadas en PAAc y PAAm son uno de los pocos sistemas que presentan comportamiento UCST²¹⁻²⁷. El origen de este comportamiento está basado en la existencia de interacciones entre las cadenas de poliacrilamida y el poli(ácido acrílico) que forman policomplejos con una

estructura en escalera con huecos^{28,29}. Posteriormente, Tanaka y colaboradores¹ describieron estas interacciones como interacciones “cremallera” entre las moléculas debidas a puentes de hidrógeno y que pueden romperse en medio acuoso calentando.

Se han estudiado los microgeles UCST y caracterizado utilizando distintas técnicas^{30,31}, sin embargo, la dinámica de las cadenas de polímero de estos microgeles aún no se ha investigado. Los resultados del presente capítulo muestran claramente la interacción entre las cadenas de los polímeros que constituyen los microgeles, la cual afecta fuertemente a la dinámica del polímero de tal forma que el coeficiente de difusión del modo de respiración de las cadenas de polímero se mejora cuando la temperatura se eleva. La reducción de movimientos difusionales de las cadenas de polímero a baja temperatura es concomitante con la formación de interacciones intercatenarias entre los grupos amida de la poliacrilamida y los grupos carboxílicos de las cadenas de poli(ácido acrílico), explicando así la reducción de la capacidad de hinchamiento del microgel debido a estas interacciones.

5.2- MATERIALES Y MÉTODOS

5.2-1. Materiales

Acrilamida (AAm) y acrilato sódico (AAc) se compraron en Panreac. NN-metilenbisacrilamida (BIS), peroxodisulfato amónico, N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) y Span 80 se compraron a Fluka. La membrana de diálisis (12,000 – 14,000 MWCO) se compró a Spectrum Medical Industries. Todos los reactivos se usaron como se recibieron sin purificaciones posteriores.

5.2-2. Métodos

Síntesis de los microgeles

Se prepararon microgeles con comportamiento UCST usando el método de polimerización por emulsión concentrada. La emulsión concentrada se preparó con una pequeña fracción de fase oleosa, la cual constituye la fase continua, de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura³². Los microgeles con 100% de PAAm o PAAc se obtuvieron llevando a cabo el siguiente procedimiento: 5 mL de una solución acuosa conteniendo acrilamida (17 mmol / 1.25 g) o acrilato sódico (17 mmol / 1.6 g), NN-metilenbisacrilamida (12.5 mg) y peroxodisulfato amónico (25 mg), se añadió lentamente con jeringuilla sobre la fase oleosa continua, la cual estaba formada por 750 μ L de dodecano y 250 μ L de Span 80. La emulsión se homogeneizó por agitación mecánica y se purgó con nitrógeno para remover el oxígeno residual. La polimerización se inició añadiendo 63 μ L de TEMED a la emulsión. Tras 5 horas de reacción, el polímero se precipitó y lavó un mínimo de tres veces con etanol frío. Finalmente los microgeles se aislaron por centrifugación (10,000 rpm) durante 10 minutos a 10 °C, se liofilizaron y se guardaron. Para producir microgeles constituídos por poliacrilamida y poli(ácido acrílico), parte del monómero se sustituyó por una cantidad específica de poliacrilamida lineal (la concentración está dada como mmol de unidades repetidas). La Tabla 5.1 muestra la composición de los microgeles de cada muestra.

Tabla 5.1. Composición de los microgeles sintetizados.

	Fase acuosa					Fase oleosa	
Nombre Muestra	AAm (mmol)	AAc (mmol)	PAAm lineal (mmol)	BIS (mmol)	Agua (ml)	Span 80 (μl)	Dodecano (μl)
PAAm neta	17	0	0	0.08	5	250	750
PAAc/PAAm 30/70	0	5	12	0.08	5	250	750
PAAc/PAAm 50/50	0	8.5	8.5	0.08	5	250	750
PAAc/PAAm 60/40	0	10	7	0.08	5	250	750
PAAc neto	0	17	0	0.08	5	250	750

Los microgeles se estudiaron usando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6400 a un voltaje de aceleración de 20 kV y los espectros de FTIR-ATR se tomaron con un espectrómetro FTIR Nicolet IR200 equipado con un dispositivo de reflexión atenuada total (ATR) conteniendo cristal de ZnSe (Foundation SpeculATR) acoplado con un Peltier (Linkam Scientific). Los blancos del espectro se tomaron antes de cada espectro de las muestras y posteriormente se sustrajeron. Específicamente, para cada muestra conteniendo un 2% de microgeles dispersos en agua, se usó de blanco una solución idéntica sin el polímero. Cada espectro de las muestras es el resultado de 256 acumulaciones. La corrección de la línea base se llevó a cabo usando el programa IGOR pro (versión 6.22A) por sustracciones polinomiales para hacer plana la línea base alrededor de los picos de interés de modo similar al descrito por Cremer y

colaboradores³³. El hinchamiento de los microgeles se estudió con un microscopio óptico (Leica DM4000) acoplado a un Peltier (Linkam Scientific). Para el estudio de distribución de tamaño en función de la temperatura, se dispersaron microgeles liofilizados en agua a un pH específico durante 24 horas y se observó con un microscopio óptico a distintas temperaturas. Se recogieron doscientas partículas aleatoriamente de fotografías del microscopio óptico y sus diámetros se midieron usando ImageJ (versión 1.45) para calcular el diámetro medio³⁴. La dinámica molecular de los microgeles se usó utilizando dispersión de neutrones elástica incoherente (IES) y dispersión de neutrones cuasielástica (IQNS). Los experimentos se llevaron a cabo en el Instituto Laue Langevin en Grenoble (ILL) usando el espectrómetro de retrodispersión de neutrones de alta energía de resolución (1 μeV) IN10, y el espectrómetro de neutrones fríos TOF IN5 que proporciona una energía de resolución elástica de 100 μeV . El resultado en un experimento de dispersión de neutrones es la función de dispersión $S(Q, \omega)$ que contiene información acerca de la estructura y dinámicas de la muestra ($Q = 4\pi/\lambda \sin\theta$ es el vector de dispersión con θ y λ siendo la mitad del ángulo de dispersión y la longitud de onda del neutrón incidente, respectivamente, y ω es la frecuencia angular). Los espectros cuasielásticos se recogieron a 17 °C (290 K) y 57 °C (330 K) usando un soporte de muestras con geometría de doble pared y cilindro hueco, el cual se selló para evitar la evaporación del D_2O durante las medidas. El grosor y concentración de la muestra (2%) se seleccionó para producir una transmisión de alrededor del 85%. Los procedimientos y programas estándar del ILL se usaron para las correcciones, normalización y ajuste del pico cuasielástico. Ya se ha reportado previamente³⁵ una descripción más detallada de los métodos.

5.3- RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN

5.3-1. Hinchamiento

Después de la polimerización de la fase interna de la emulsión concentrada, se obtienen microgeles con un tamaño cercano a las 5 μm y con forma esférica tal como revelaron las pruebas de SEM, ver Figura 5.1.

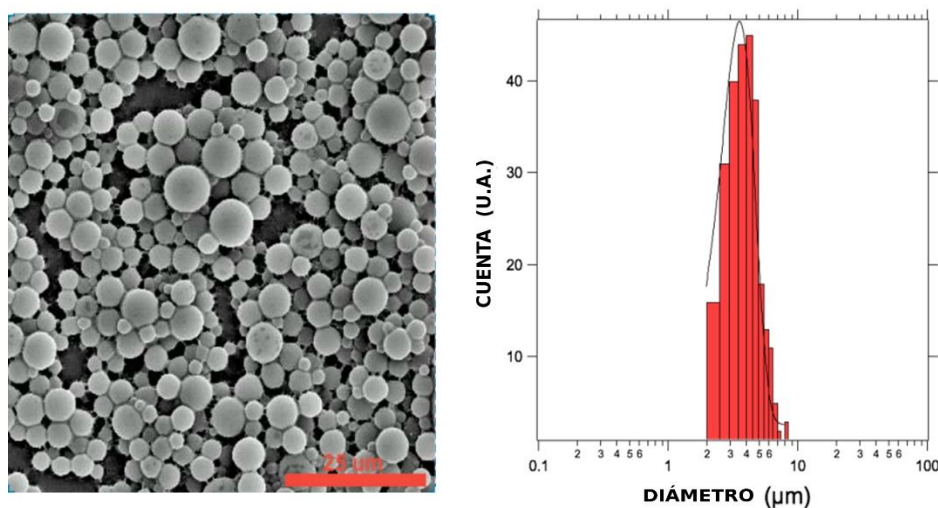


Figura 5.1: A la izquierda, fotografía de SEM de microgeles interpenetrados (PAAm/PAAc 50/50) preparados por polimerización por emulsión concentrada. A la derecha, distribución de tamaño de los microgeles bajo las condiciones de la cámara de vacío del SEM.

La respuesta de estos microgeles frente a la temperatura está fuertemente afectada por el pH del entorno, porque dentro de la matriz hay grupos carboxílicos que pueden protonarse y pueden cambiar las interacciones electrostáticas dentro de los microgeles. Con el fin de determinar el óptimo pH al cual sucede la transición de volumen de fase, se ha medido el diámetro de los microgeles PAAc/PAAm a distintos pH. La Figura 5.2 representa el diámetro de los microgeles PAAc/PAAm 50/50 en función de la temperatura y el pH.

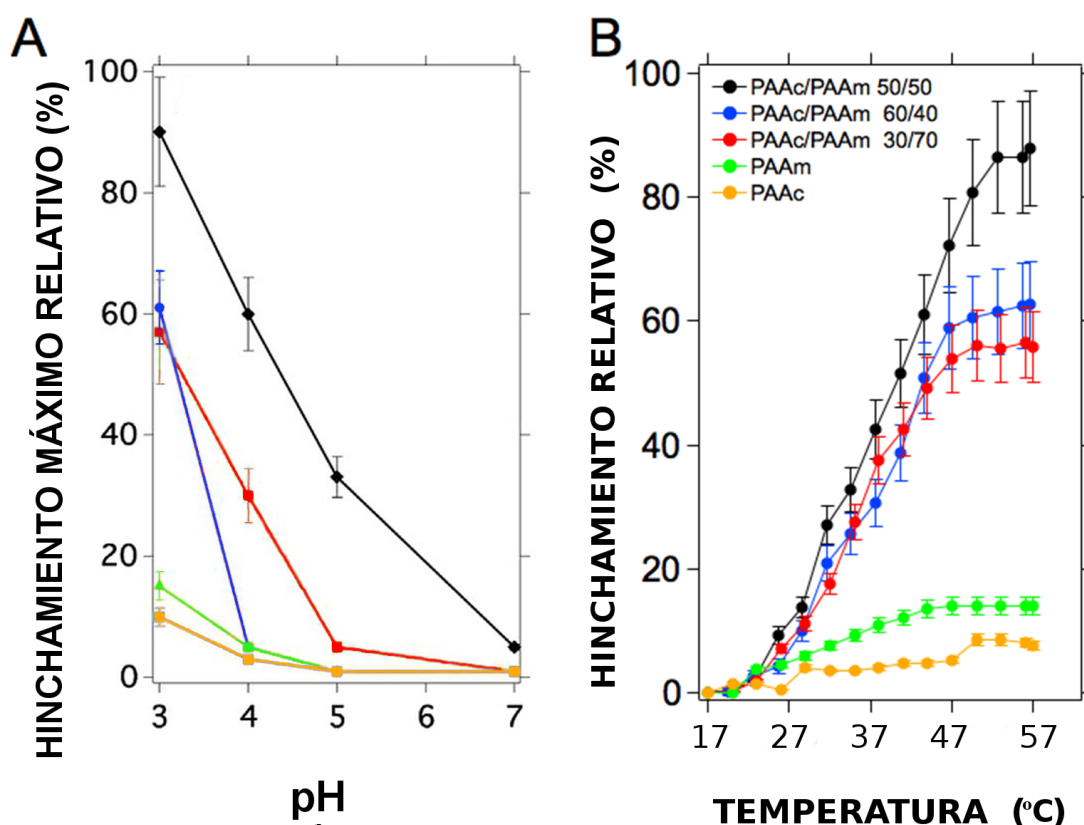


Figura 5.2. A) Hinchamiento relativo máximo de microgeles de distinta composición a diferentes pH B) Hinchamiento relativo de microgeles con distinta composición en función de la temperatura.

En la Figura 5.2(A) se muestra el hinchamiento relativo máximo en función del pH cuando los microgeles se calientan a 57 °C. Se muestra que la variación de volumen es mayor cuando los microgeles están al pH más bajo utilizado en estos experimentos (pH 3). Este resultado indica que es necesario tener los grupos carboxílicos protonados dentro de los microgeles para tener una respuesta térmica marcada, lo que concuerda con trabajos previos publicados por Peppas y colaboradores³⁶. Con el objetivo de evaluar el efecto de la composición del microgel en la transición de fase de volumen, se estudió el hinchamiento de microgeles con distinta composición en función de la temperatura. Para llevarlo a cabo, los microgeles se dispersaron en agua a pH 3, así a este pH la transición de fase de volumen para estos microgeles alcanza el máximo como ya se ha

observado en la Figura 5.2(A). Como se muestra en la Figura 5.2(B), los microgeles muestran una gran diferencia en el tamaño tras el calentamiento y este efecto se ve que depende de su composición. De hecho, se observó que los microgeles de PAAc netos y los microgeles de PAAm netos aumentaron su volumen ligeramente pero nada comparado con los microgeles compuestos por cadenas de PAAc y PAAm, los cuales sufrieron cambios intensos en sus hinchamientos relativos cuando se calentaron. Tales cambios fueron más intensos cuando la composición de la matriz polimérica fue equimolar para PAAc y PAAm. Estos resultados indican que la coexistencia de PAAc y PAAm en la misma matriz provoca una reducción del grado de hinchamiento que es parcialmente revertido tras incrementar la temperatura del medio.

5.3-2. Dispersión de Neutrones

De acuerdo con la teoría de Flory, el hinchamiento del gel está gobernado por tres términos: la elasticidad de la red del polímero (término elástico), la solubilidad (término de mezcla) y la carga de la red (término iónico)³⁷⁻⁴⁰. El primer término compite contra los otros dos para colapsar los microgeles. En los microgeles sintetizados, la coexistencia de cadenas de PAAc y PAAm reduce el grado de hinchamiento. Este hecho podría explicarse como un incremento del término elástico en la red del polímero debido a la formación de interacciones entre ambas cadenas del polímero. Para probar esta hipótesis desde un punto de vista microscópico, se ha estudiado la dinámica de los microgeles usando IQNS. De las medidas se obtuvo $S_{inc}(Q, \omega)$ de los átomos de hidrógeno y así se pudo de estudiar la dinámica de las cadenas poliméricas a las que los átomos de hidrógeno están anclados. Cuando los objetos de estudio son dispersiones de microgel en agua deuterada, las señales de dispersión coherente e incoherente del solvente se

tienen que separar de las que vienen de la muestra. Hay que tener en cuenta que la dispersión de fondo o los instrumentos de tiempo-de-vuelo no permiten discriminar entre la dispersión coherente e incoherente, así las medidas contienen ambas contribuciones. Sin embargo, la dispersión coherente del agua líquida base aparece predominantemente concentrada en los picos O-H intermoleculares a $Q=1.8$ y 3.3 \AA^{-1} ⁴¹. Por otro lado, el primer pico de hielo cristalino aparece a $Q = 1.597 \text{ \AA}^{-1}$ ⁴². Teniendo esto en cuenta, es posible evitar la mayor parte de la dispersión coherente del agua ajustando los experimentos y colocando los detectores a valores de Q inferiores a 1.5 \AA^{-1} donde la estructura del agua no se observa y la contribución coherente es muy pequeña. Sin embargo, los datos se presentan como $S(Q, \omega)$ en vez de $S_{inc}(Q, \omega)$ porque algún resto de dispersión coherente puede contribuir ligeramente a los valores altos de Q .

Se utilizó dispersión inelástica de neutrones para obtener información espacio y tiempo dependientes sobre las dinámicas microscópicas⁴³⁻⁴⁵. La función de dispersión elástica de neutrones $S(Q, 0)$ se midió en función de la temperatura con IN10 usando el método llamado “ventana elástica fija”⁴³. Los escaneos elásticos dan una idea sobre la dependencia de la temperatura en la dinámica molecular. Gracias a esto, se ha determinado la escala espacial de los movimientos vibracionales de las partículas (mayoritariamente hidrógeno). El desplazamiento cuadrático medio $\langle u^2 \rangle$, que se obtiene tras analizar la dependencia de Q de $S_{inc}(Q, 0)$ a una temperatura fija normalizada al valor de $-83 \text{ }^\circ\text{C}$ viene dado por la ecuación:

$$\ln \frac{S_{inc}(Q, 0)}{S_{inc}(Q, 0)_{-83^\circ\text{C}}} = -\frac{1}{3} (\langle u^2(T) \rangle - \langle u^2(-83) \rangle) \cdot Q^2 \quad [5.5]$$

$S_{inc}(Q,0)_{-83^{\circ}C}$ es la dispersión elástica a $-83^{\circ}C$, por debajo de la temperatura de congelación de la dispersión acuosa del microgel donde se supone que no hay movimientos de las cadenas del polímero puesto que están atrapadas en el agua congelada.

En la Figura 5.3 se muestra la diferencia $\langle u^2(T) \rangle - \langle u^2(-83) \rangle$, denominado ($\Delta \langle u^2 \rangle$), obtenido de distintas muestras en función de la temperatura.

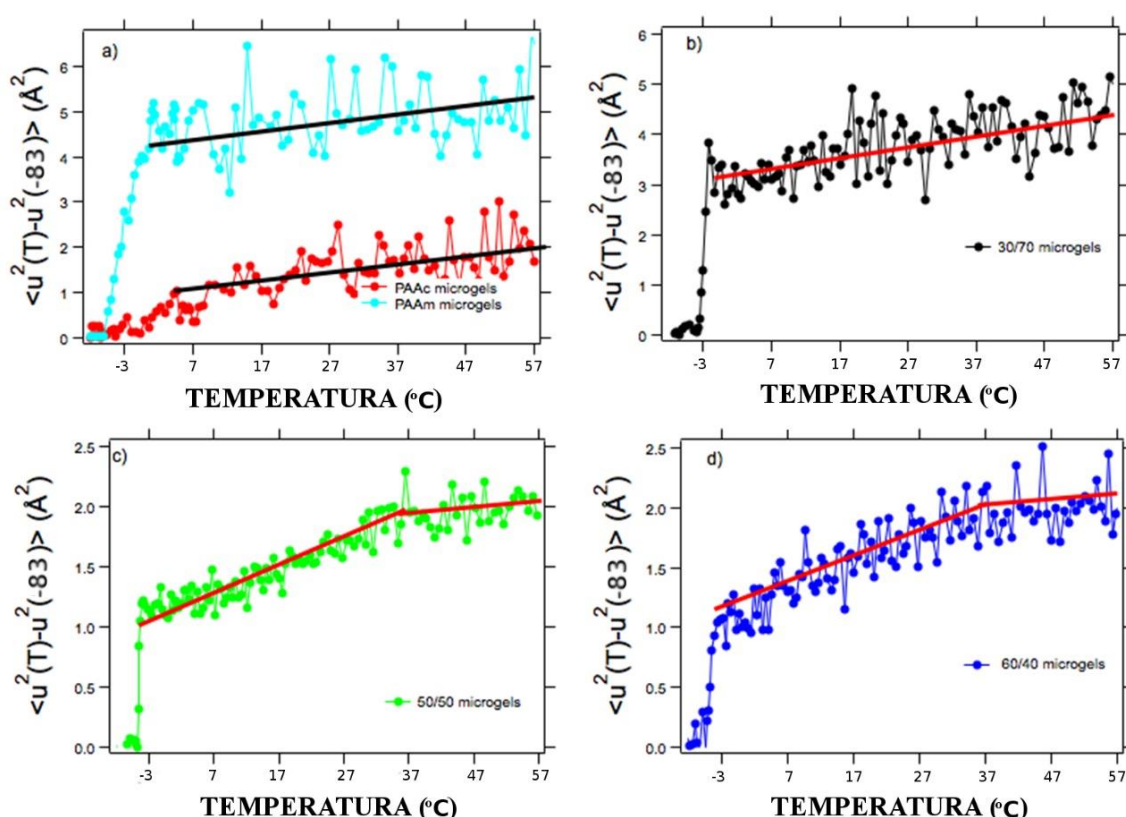


Figura 5.3. Oscilaciones de la amplitud vibracional en función de la temperatura de las redes de polímero a) microgeles PAAc y PAAm netos, b) PAAc/PAAm 30/70, c) PAAc/PAAm 50/50, d) PAAc/PAAm 60/40. El ratio de calentamiento fue de $0.4^{\circ}C/min$.

Por encima de $-3^{\circ}C$, la amplitud de las oscilaciones de vibración se incrementa de forma abrupta debido a que el agua deuterada empieza a fundirse, lo que permite la activación de los movimientos de las cadenas de los polímeros al quedar liberadas de la prisión de

agua congelada. En esta región de temperatura, se puede observar una diferencia sustancial en la amplitud de las oscilaciones vibracionales de las distintas muestras. A 5°C $\Delta\langle u^2 \rangle$ es $<5 \text{ \AA}^2$ para los microgeles de PAAm netos y $<1 \text{ \AA}^2$ PAAc netos, y en caso de los microgeles PAAc/PAAm 50/50 el valor ronda 1.5 \AA^2 . Esta diferencia podría atribuirse al hecho de que a pH ácido, las cadenas de PAAc no están totalmente solvatadas, lo que hace que se comporte como un semisólido. En el caso de microgeles 50/50, el valor es de alrededor de 1.5 \AA^2 lo que muestra una destacada influencia de la composición del microgel en el desplazamiento cuadrático medio de los segmentos del polímero que parecen estar obstaculizados cuando coexisten PAAc y PAAm dentro de la red de polímero. De 4 °C a 57 °C, $\Delta\langle u^2 \rangle$ aumenta con la temperatura para todas las muestras. Es interesante que los microgeles PAAc/PAAm 50/50 Y PAAc/PAAm 60/40 muestran dos pendientes, una comprendida entre -3 °C y 37 °C, que está caracterizada por un rápido incremento de $\Delta\langle u^2 \rangle$, y una segunda pendiente de 37 °C a 57 °C que es menos pronunciada.

El incremento de $\Delta\langle u^2 \rangle$ indica una ganancia de libertad de movimiento cuando se incrementa la temperatura que es mayor al principio que al final del experimento. Se puede explicar este comportamiento como el resultado de la existencia de interacciones entre las cadenas de polímero de PAAc y de PAAm. Tales interacciones podrían hacer que las cadenas de PAAm perdieran libertad de movimiento, lo que reduciría la amplitud de oscilación vibracional de todo el sistema. Cuando el sistema se calienta, estas interacciones empiezan a disminuir conduciendo a una pérdida en la rigidez y llevando a un rápido incremento en la amplitud de las oscilaciones vibracionales. La libertad de movimiento alcanza el valor máximo a 37 °C, desde el que la red de polímero no podría

ganar más flexibilidad debido al agente entrecruzante, que impondría restricciones de movimiento que la temperatura no puede superar.

Teniendo en cuenta la presencia de estas dos regiones, se ha investigado con IN10 la IQNS a 17 °C y 57 °C, por debajo y por encima del punto de transición. Sin embargo, como se comentó antes, una posible contribución a la señal de dispersión incoherente del polímero podría provenir de la dispersión incoherente del agua. En nuestros experimentos la relación $\sigma_{inc}(\text{microgeles})/\sigma_{inc}(\text{total})$ es 0.54 y el resto de la señal incoherente viene del solvente (D_2O). Sin embargo, la dinámica del agua deuterada es alrededor de 2 órdenes de magnitud más rápida que la dinámica del polímero. Para corroborar esta afirmación se realizaron medidas en IN5 ya que el rango de energía de este instrumento permite observar la contribución de la dispersión incoherente del agua y del polímero, y debido a las distintas escalas de tiempo del solvente y de la dinámica del polímero principal, la contribución del solvente se puede eliminar. La Figura 5.4 muestra un espectro de IQNS de microgeles PAAc/PAAm 50/50 a 17 °C y 57 °C medidos en IN5. A 17 °C el agua dio una contribución cuasielástica en el rango de energía de meV que se amplía cuando la temperatura se incrementa a 57 °C.

En la Figura 5.4 se puede observar que la señal de dispersión de los microgeles es el resultado de dos componentes, la dinámica de las moléculas del agua y la dinámica de los polímeros. A 57 °C el microgel se encuentra en su estado hinchado produciendo un incremento en la contribución de dispersión del polímero alrededor del pico elástico en comparación con los obtenidos a 17 °C, mientras que la contribución del agua deuterada se ensancha debido al incremento de la movilidad de las moléculas del agua. El espectro registrado en IN5 muestra que la contribución del solvente a la dispersión

incoherente se puede separar como un fondo constante en la ventana de $\pm 15 \mu\text{eV}$ de IN10.

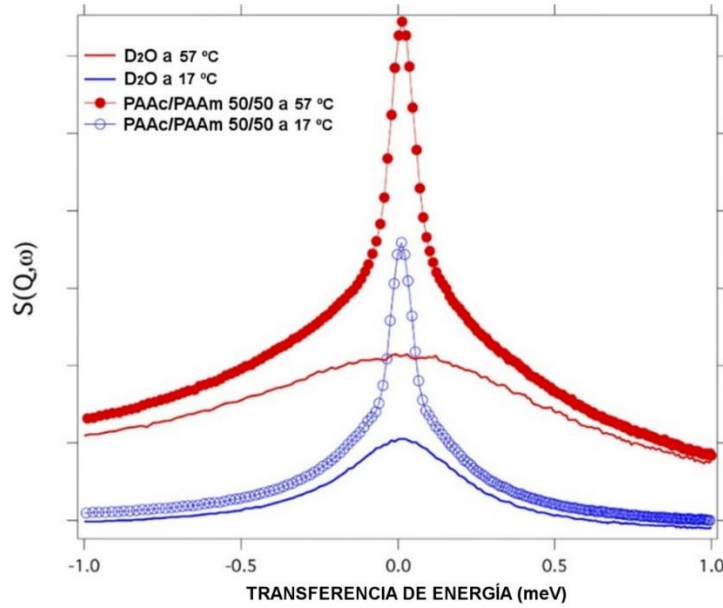


Figura 5.4: Espectro de dispersión de neutrones cuasi-elástico en IN5 a $Q = 0.45 \text{ \AA}$ para microgeles interpenetrados 50/50 a 17 °C (azul) y 57 °C (rojo) respectivamente. Las líneas continuas inferiores son los resultados experimentales del espectro de dispersión cuasi-elástico del D_2O medido en las mismas condiciones de temperatura que los microgeles.

La Figura 5.5 muestra un espectro obtenido en IN10 a las dos temperaturas estudiadas y a diferentes valores de Q . Del ajuste con la función Lorentziana, obtenemos la mitad de la anchura a la mitad del máximo $\Gamma(Q)$, del cual el tiempo de relajación de la red del polímero puede expresarse como:

$$\Gamma(Q) = (\hbar/2\pi) \cdot DQ^2 \quad [5.6]$$

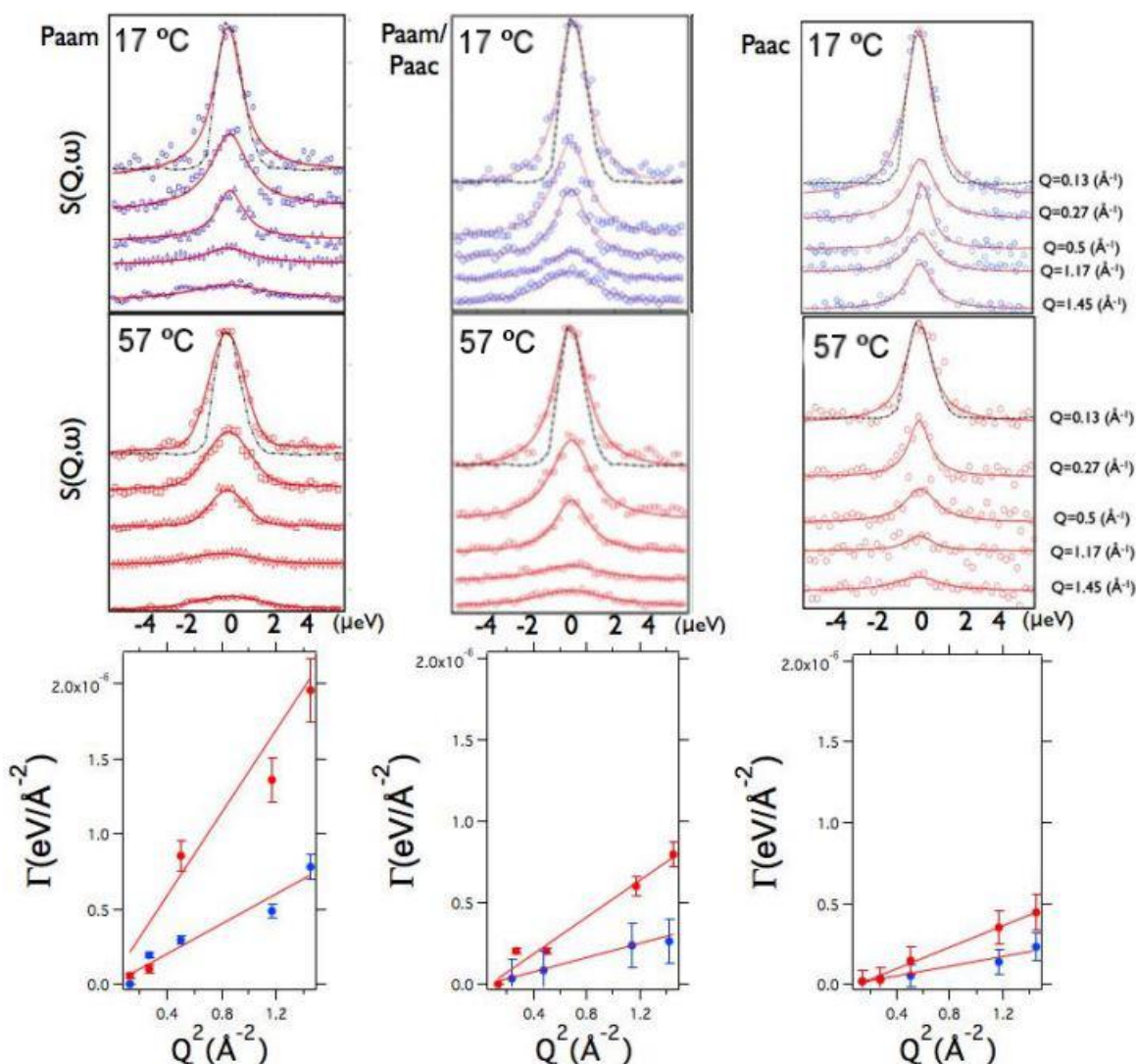


Figura 5.5. La función $S(Q, \omega)$ de microgeles PAAm, PAAm/PAac 50/50 y PAac en el estado colapsado (17 °C) y en el estado hinchado (57 °C). La línea punteada representa la función de resolución del instrumento. En la parte inferior, la mitad de la anchura a la mitad del máximo $\Gamma(Q)$ de la componente Lorentziana cuasielástica medida en el espectrómetro IN10 en función de Q^2 para distintas composiciones a 17 °C (azul) y a 57 °C (rojo).

A diferencia de los microgeles de PNIPAM la variación del coeficiente de difusión (D) sigue la misma tendencia que la mayoría de sólidos y líquidos para los que D se incrementa cuando se aumenta la temperatura. La Figura 5.6 representa el coeficiente de difusión de los segmentos poliméricos en función de la composición del microgel para

las dos temperaturas estudiadas. Cuando las muestras con diferentes composiciones se analizaron se observó una fuerte influencia de la composición del polímero en el coeficiente de difusión de los segmentos.

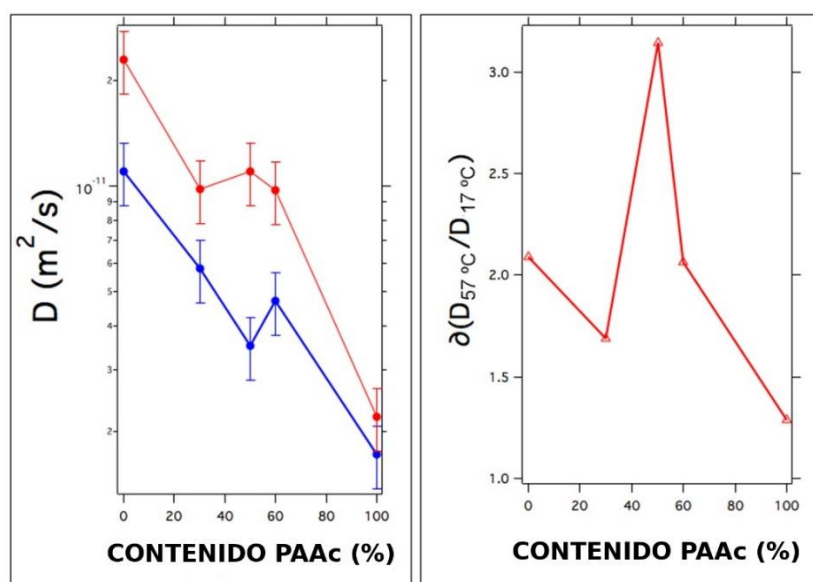


Figura 5.6: a) Coeficientes de difusión de los segmentos de las cadenas a 17 °C (azul) y a 57 °C (rojo) para microgeles con distinta composición; b) ratio entre los coeficientes de difusión de los segmentos obtenidos a alta y baja temperatura.

Independientemente de la temperatura, el coeficiente de difusión de los segmentos depende fuertemente de la composición del polímero de tal forma que aumenta cuando el ratio entre PAAc y PAAm se acerca a 1:1. Resulta interesante observar que el ratio entre los coeficientes de difusión obtenidos a altas y bajas temperaturas experimente un aumento importante para los microgeles PAAc/PAAm 50/50. Podría ser debido al hecho de que las interacciones actuarían como entrecruzantes incrementando la tensión elástica, estabilizando la matriz y evitando los movimientos de los segmentos poliméricos. Además, el aumento de la tensión elástica reduciría el hinchamiento de estos microgeles, lo cual concordaría con las

observaciones. En cambio, un incremento de la temperatura provocaría la ruptura de las interacciones intercatenarias, así se incrementa la dinámica de las cadenas de polímero resultando en un aumento de los coeficientes de difusión.

5.3-3. FTIR-ATR

Para entender en profundidad estas interacciones se ha usado espectroscopía infrarroja ya que esta técnica es muy sensible al entorno local de las moléculas, especialmente la vibración de los grupos de la amida y del ácido acrílico. La Figura 5.7 muestra espectros de FTIR-ATR para microgeles de PAAm neta, PAAc neto y PAAc/PAAm 50/50 en el estado colapsado (17 °C) e hinchado (57 °C).

El espectro de los microgeles PAAm netos (Figura 5.7(a) y 5.7(b)) muestran la presencia de dos bandas prominentes, en la región entre 1550 y 1800 cm^{-1} , que corresponden con la amida II (contribución de aleteo N-H <60% y vibración de estiramiento C-N <40%) y la amida I (que contiene contribuciones de vibración de estiramiento C=O <80% con una pequeña contribución de vibración de estiramiento C-N). Siguiendo los trabajos de Maeda^{46,47} es posible recoger información sobre las interacciones de los grupos amida analizando el perfil del espectro en esta región. Usando esta metodología, se observa una componente gaussiana simple centrada a 1606 cm^{-1} que se asignó a la banda de amida II. Como se mostró en artículos previos^{47,48}, la banda amida I de PAAm en agua, puede descomponerse en dos bandas centradas a 1635 y 1665 cm^{-1} , que pueden asignarse a los grupos C=O unidos al agua ($\text{C=O}\cdots\text{H-O}$) y a los grupos N-H amida ($\text{C=O}\cdots\text{H-N}$) a través de puentes de hidrógeno, respectivamente.

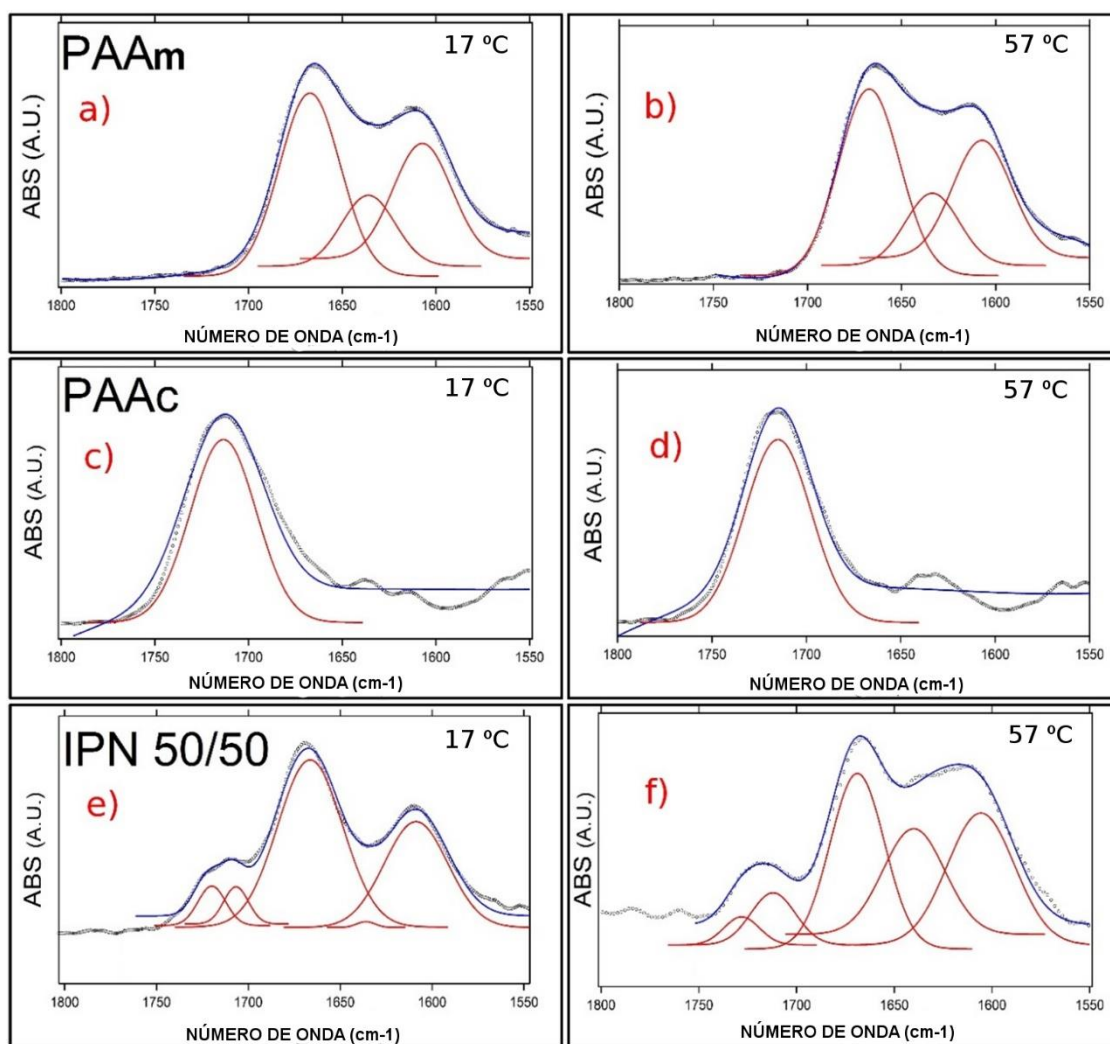


Figura 5.7. Espectro FTIR-ATR de dispersiones de microgeles formados por a) Microgeles de PAAm neta a 17 °C; b) microgeles de PAAm a 57 °C; c) microgeles de PAAc a 17 °C; d) microgeles de PAAc a 57 °C; e) microgeles PAAc/PAAm 50/50 a 19 °C; f) microgeles PAAc/PAAm 50/50 a 57 °C. Las líneas rojas representan el ajuste de cada banda y las líneas azules muestran el resultado del ajuste.

Además se analizaron los espectros infrarrojos de los microgeles PAAc netos (Figuras 5.7(c) y 5.7(d)) y en estos ejemplos observamos un pico intenso a 1712 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), que puede ajustarse con una simple componente gaussiana. Los espectros FTIR de PAAm y PAAc netos permanecen inalterados cuando la temperatura se incrementa a 57 °C. La falta de cambios sugiere que el entorno alrededor de estos grupos fue casi idéntico en el rango estudiado de

temperaturas. Por el contrario, para el microgel PAAc/PAAm 50/50 (Figuras 5.7(e) y 5.7(f)), se observa un cambio sustancial en el espectro FTIR, que presenta dos componentes, uno procedente de la parte de la PAAm y otro del PAAc. El análisis de la parte de PAAm denota la existencia del componente de la amida II, la cual está formada por una sola banda gaussiana a 1605 cm^{-1} y el componente amida I, que está ajustada con dos componentes gaussianas, una centrada a 1635 cm^{-1} atribuida a la interacción $\text{C=O}\cdots\text{H-O}$ y otra a 1665 cm^{-1} asociada a la interacción $\text{C=O}\cdots\text{H-N}$. Cuando se compara la parte amida del espectro con respecto al obtenido para los microgeles de PAAm netos, se observa una importante reducción de la intensidad de la banda centrada a 1635 cm^{-1} atribuido a las pocas moléculas de agua interaccionando con los grupos carbonilo. Se llevaron a cabo experimentos adicionales con microgeles PAAm netos secos que demostraron la ausencia de dicha banda, lo que confirmaría su relación con la presencia de agua en la estructura. Además, el perfil de las bandas del componente de PAAc remarcó que el entorno alrededor de los grupos carboxílicos cambió en las redes de PAAc/PAAm 50/50 si se compara con el espectro IR de los microgeles de PAAc netos. Dentro de la red PAAc/PAAm 50/50, la banda del carboxílico se divide en dos componentes gaussianas, una centrada en 1724 cm^{-1} y otra centrada a 1712 cm^{-1} . Teniendo en cuenta que los microgeles de PAAc netos en agua mostraron una sola componente gaussiana a 1712 cm^{-1} , se cree que la nueva banda es el resultado de la interacción entre algunos de los grupos carboxílicos con los grupos N-H de las cadenas de PAAm.

Por contraste, cuando la matriz de PAAc/PAAm 50/50 se calentó, las bandas cambiaron sustancialmente ya que el entorno alrededor de los grupos varió. Así por ejemplo, el pico amida I situado a 1635 cm^{-1} el cual se atribuye a $\text{C=O}\cdots\text{H-O}$ incrementó

tremendamente su intensidad. Este cambio podría relacionarse con el hecho de que a mayor temperatura, los grupos C=O de la PAAc romperían sus interacciones con los grupos H-N de la PAAm dando lugar a que la matriz polimérica se hinche, y permitiendo el reemplazo gradual de los grupos H-N por moléculas de agua. El análisis de los espectros de FTIR de PAAc/PAAm 50/50 a 17 °C y 57 °C mostró un incremento de la intensidad de la banda situada a 1635 cm⁻¹ mientras que la banda a 1724 cm⁻¹ disminuyó, lo cual provocaría la formación de nuevos enlaces con agua y la ruptura de las interacciones C=O...H-N.

Complementariamente a este efecto, se vio una variación significativa de la fracción molar de los grupos carboxílicos que interaccionan con las cadenas de PAAm (χ_{COOH}). Esta fracción puede calcularse de la siguiente forma:

$$X_{COOH} = \frac{Area_{1712cm^{-1}}}{Area_{1712cm^{-1}} + Area_{1724cm^{-1}}} \quad [5.7]$$

Así, se puede concluir que la fracción de grupos carboxílicos que interaccionan con PAAm cambió de 0.62 a 0.25 cuando la temperatura se elevó de 17 °C a 57 °C confirmando el resultado de la ruptura de las interacciones C=O...H-N, lo cual ocurriría debido al incremento de temperatura. Como consecuencia, la matriz del polímero reduciría sus interacciones intracatenarias dando una mayor capacidad de hinchamiento del microgel. En resumen, los espectros FTIR parecen indicar que el incremento de temperatura fue concomitante con una variación del entorno del polímero en la red IPN.

La TDC 4 representa la configuración de la matriz para matrices de los microgeles PAAc/PAAm a baja y a alta temperatura.

La red compuesta por PAAc y PAAm muestra claras evidencias de interacciones intercatenarias a 17 °C las cuales se rompen a 57 °C permitiendo el intercambio parcial de las interacciones $C=O\cdots H-N$ por interacciones $C=O\cdots H-O$, las cuales conducirían a un incremento del ratio de hinchamiento. Se puede concluir que el estado colapsado de la matriz PAAc/PAAm es principalmente debido a la existencia de puentes de hidrógeno entre las cadenas de polímero que constituyen la red, aunque no se descarta una contribución adicional proveniente de las interacciones intercatenarias hidrofóbicas a 17 °C debido a la proximidad de las cadenas de polímero.

5.4- CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En este capítulo se ha estudiado desde el punto de vista macroscópico y microscópico el comportamiento de hinchamiento en función de la temperatura de microgeles constituidos por cadenas de poliacrilamida y poli(ácido acrílico) en distintas proporciones. Estos parámetros parecen ser cruciales para obtener una respuesta térmica ya que se necesita la presencia de ambos componentes en la matriz para establecer interacciones reversibles que controlan el grado de hinchamiento de los microgeles. Estas interacciones parecen ser específicas entre los grupos $CONH_2$ de la poliacrilamida y los grupos $COOH$ del poli(ácido acrílico). La necesidad de tener protonados los grupos carboxílicos hace que este comportamiento de hinchamiento sea también pH dependiente. Cuando estos dos requisitos (pH y composición) se cumplen, los microgeles de PAAm/PAAc presentan una transición de volumen de fase continua

que se dispara por la temperatura, lo que resulta en un incremento del hinchamiento relativo de los microgeles tras el calentamiento. Echando un vistazo en el interior de la matriz del microgel se pueden observar características interesantes de la dinámica de las cadenas del polímero. Así por ejemplo, la $\Delta\langle u^2 \rangle$ parece verse afectada por la composición de la matriz polimérica de tal forma que cuando aparecen las interacciones interpoliméricas, la $\Delta\langle u^2 \rangle$ disminuye. Se observó una tendencia similar en el coeficiente de difusión de las cadenas poliméricas. A 17 °C las cadenas de polímero tienen restricciones en la libertad de movimientos que pueden revertirse parcialmente tras incrementar la temperatura. Con el objetivo de comprender tales restricciones de movimiento, se estudiaron los espectros de infrarrojos de los microgeles PAAm/PAAc. El análisis de los espectros infrarrojos manifestaron la presencia de interacciones intercatenarias entre los grupos C=O del PAAc y los grupos NH₂ de la PAAm a 17 °C. Estos grupos interaccionarían a través de puentes de hidrógeno (C=O...H-N) dando como resultado un incremento en la tensión elástica de los microgeles. Por otro lado, el incremento de temperatura parece romper parcialmente estas interacciones permitiendo a los microgeles relajarse y por tanto que la matriz se hinche.

5.5- REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- 1- Illmain F.; Tanaka T.; Kokufuta E., *Nature*. 1990 349, 400.
- 2- Motornov M.; Roiter Y.; Tokarev I.; Minko S. *Prog. Polym. Sci.* 2010, 35, 174.
- 3- Dimitrov I.; Trzebicka B.; Müller A.H.E.; Dworak A., Tsvetanov C.B. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 1275.
- 4- Rubio-Retama, J.; López-Cabarcos, E.; López-Ruiz, B. *Biomaterials* 2003, 24, 2965.
- 5- Owens III D.E.; Jian Y.; Fang J.E.; Slaughter B.V.; Chen Y.; Peppas N.A. *Macromolecules* 2007, 40, 7306.
- 6- Liu T.; Hu S.; Liu D.; Chen S.; Chen I. *Nano Today* 2009, 4, 52.
- 7- Ward M.A.; Georgiou T.K. *Polymers* 2011, 3, 1215.
- 8- Meng F.; Zhong Z.; Feijen J. *Biomacromolecules* 2009, 10, 2
- 9- Daly, E.; Saunders, B. R. *Langmuir* 2000, 16, 5546.
- 10- Nerapusri, V.; Keddie, J. L.; Vincent, B.; Busnak, I. A. *Langmuir* 2006, 22, 5036.
- 11- Meunier, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. *Polym. Adv. Technol.* 1994, 6, 489.
- 12- Karg M.; Pastoriza-Santos I.; Rodríguez-González B.; Klitzing R.; Wellert S.; Hellweg T. *Langmuir* 2008 24, 6300.
- 13- Owens, D. E.; Jian, Y.; Fang, J. E.; Slaughter, B. V.; Chen, Y. H.; Peppas, N. A. *Macromolecules* 2007, 40, 7306.
- 14- Fernández-Barbero, A.; Suárez, I.; Sierra-Martín, B.; Fernández-Nieves, A.; Nieves, F.J.; Marquez, M.; Rubio-Retama, J.; López-Cabarcos, E. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2009, 147, 88.
- 15- Pelton, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2000, 85, 1.
- 16- Brazel C.S.; Peppas N.A. *Macromolecules* 1995, 28, 8016.
- 17- Zhang J.; Peppas N.A. *Macromolecules* 2000, 33, 102
- 18- Hellweg T.; Dewhurst C.D.; Eimer W.; Kratz K. *Langmuir* 2004, 20, 4330.
- 19- Adelsberger J.; Kulkarni A.; Jain A.; Wang W.; Bivigou-Koumba A.M.; Busch P.; Pipich V.; Holderer O.; Hellweg T.; Laschewsky A.; Müller-Buschbaum P.; Papadakis C.M. *Macromolecules* 2010, 43, 2490.
- 20- Liétor-Santos J.J.; Gasser U.; Zhou J.; Hu Z.; Fernández-Nieves A.; Crystal of microgel particles, In: *Hydrogel Micro and Nanoparticles* (Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012).
- 21- Yoshimitsu H.; Kanazawa A.; Kanaoka S.; Aoshima S. *Macromolecules* 2012, 45(23), 9427.
- 22- Seuring J.; Agarwal S. *Macromolecular Rapid Communications* 2012, 33(22), 1898.

- 23- Zhang Q.; Schattling P.; Theato P.; Hoogenboom R. *Polymer Chemistry* 2012 , 3(6), 1418.
- 24- Seuring J.; Agarwal S.; *Macromolecules* 2012 , 45(9), 3910.
- 25- Seuring J.; Bayer F.; Huber K.; Agarwal S. *Macromolecules* 2012 , 45(1), 374.
- 26- Diehl C.; Dambowsky I.; Hoogenboom R.; Schlaad H. *Macromolecular Rapid Communications* 2011 , 32(21), 1753.
- 27- Can A.; Hoeppener S.; Guillet P.; Gohy J-F.; Hoogenboom R.; Schubert U.S. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2011 , 49(17), 3681.
- 28- Baranovsky V., Kazarin LA., Litmanovich AA., Papisov IM.; *Eur. Polym. J.*; 1984; 20; 191
- 29- Eustace DJ., Siano DB, Drake EN.; *J. Appl. Polym. Sci.*; 1988, 35, 707
- 30- Okano, T. *Adv. Polym. Sci.* 1992, 110, 179.
- 31- Echeverria, C.; López, D.; Mijangos, C. *Macromolecules* 2009, 42 9118.
- 32- Rubio-Retama, J.; López-Cabarcos, E.; López-Ruiz, B. *Talanta* 2005, 68, 99.
- 33- Sagle, L. B.; Zhang, Y.; Vladislav, A. L.; Chen, X.; Cho, Y.; Cremer, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 132, 9304.
- 34- Rubio-Retama, J.; Tamimi, F. M.; Heinrich, M.; López-Cabarcos, E. *Langmuir* 2007, 23, 8538.
- 35- Rubio-Retama, J.; Frick, B.; Seydel, T.; Stamm, M.; Fernandez-Barbero, A.; López-Cabarcos, E. *Macromolecules* 2008, 41, 4739.
- 36- Fang, J. E.; Slaughter, B. V.; Chen, Y. H.; Peppas, N. A. *Macromolecules* 2007, 40, 7306.
- 37- Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press: London, 1953.
- 38- Hirotsu, S. *Phase Transitions* 1994, 47, 183.
- 39- Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed.; Marcel Dekker: New York, 1997.
- 40- Shibayama, M.; Tanaka, T. In *Advances in Polymer Science*; Springer -Verlag: Berlin, 1993
- 41- Petkov, V.; Peng, Y.; Willians, G.; Huang, B.; Tomalia, D.; Ren, Y. *Phys. Rev. B* 2005, 72, 195402.
- 42- Wollan, E. O.; Davidson, L.; Shull, C. G. *Phys. Rev.* 1949, 75, 1348.
- 43- Bee, M.; Hilger, A. *Quasielastic Neutron Scattering*; IOP: Bristol, 1988.
- 44- Ryong-Joon, R. *Methods of X-ray and Neutron Scattering in Polymer Science*; Oxford University Press, Inc.: New York, 2000.
- 45- Tyagi, M.; Arbe, A.; Alegría, A.; Colmenero, J.; Frick, B. *Macromolecules* 2007, 40, 4568.

- 46- Yamauchi, H.; Maeda, Y. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 12964.
- 47- Maeda, Y.; Higuchi, T.; Ikeda, I. *Langmuir* 2000, 16, 7503.
- 48- Rubio-Retama J.; Zafeiropoulos, N.; Frick, B.; Seydel, T.; López-Cabarcos, E. *Langmuir* 2010, 26, 7101.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

6.- CONCLUSIONES GENERALES

1. Mediante un sistema híbrido modelo de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro funcionalizadas con un copolímero de poliestireno-b-poli(2vinilpiridina), se pudo realizar una emulsión sensible a campos magnéticos.
2. Se propuso un sistema teranóstico sintetizado mediante el método “injerto desde” por el cual se hicieron crecer cadenas de policaprolactona alrededor de un núcleo de nanopartículas magnéticas. Este sistema se cargó con cumarina comprobando la capacidad del mismo de liberarla mediante la generación de calor por inducción magnética. De igual forma se comprobó su viabilidad como agentes de contraste siendo utilizados para ensayos *in vivo* en ratas, registrando su seguimiento por el organismo a través de resonancia magnética de imagen.
3. Mejorando el sistema modelo, se realizó un sistema híbrido de un núcleo de nanopartícula magnética recubierta de una corteza de sílice a la cual se le anclaron dos polímeros anfifílicos de metoxi-polietilenglicol y policaprolactona. Este sistema sirvió para cargarlo de una molécula muy lipófila como es el 2-amino-4,6-difenilbenzoato de etilo (ADE). Esta molécula pudo disolverse en un medio acuoso. Además, todo el sistema híbrido cargado con ADE pudo ser desplazado del medio gracias a su sensibilidad a campos magnéticos externos.

4. Se estudió un modelo de red semi-interpenetrada con comportamiento UCST mediante dispersión de neutrones y espectroscopía infrarroja. Este comportamiento de hinchamiento del gel interpenetrado se comprobó que es debido a interacciones intercatenarias de las cadenas de poliacrilamida y poli(ácido acrílico) por puentes de hidrógeno. Estos puentes de hidrógeno son sensibles al aumento de temperatura, la cual provoca su ruptura y el aumento de difusión de las cadenas de los polímeros permitiendo la entrada de agua en el sistema e incrementando su volumen.

**PUBLICACIONES Y
COMUNICACIONES EN
CONGRESOS HASTA LA
FECHA**

Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

1- Título: **Poly(ethyleneglycol- ϵ -caprolactone)@Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic resonance imaging and drug delivery system**

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Fecha de realización: 08/09/2013

Ciudad: MADRID, España

DAVID SERRANO RUIZ; JESÚS RUIZ CABELLO; ENRIQUE LÓPEZ CABARCOS; JORGE RUBIO RETAMA.

2- Título: **Synthesis of a hybrid nanomaterial based on core@shell Fe₃O₄@Au nanoparticles coated with an amphiphilic star shaped copolymer**

Nombre del congreso: Surface Functionalization and Nanobiocomposites

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Szeged, Hungría

Fecha de realización: 20/05/2013

PAULINO ALONSO CRISTOBAL; MARCO LAURENTI; DAVID SERRANO RUIZ; BENITO JORGE RUBIO RETAMA; ENRIQUE LOPEZ CABARCOS.

3- Título: **Magnetically recoverable subnanometer nanoparticles and their use as catalyst**

Nombre del congreso: Surface Functionalization and Nanobiocomposites

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Szeged, Hungría

Fecha de realización: 20/05/2013

ENRIQUE LOPEZ CABARCOS; MARCO LAURENTI; PAULINO ALONSO CRISTOBAL; DAVID SERRANO RUIZ; BENITO JORGE RUBIO RETAMA.

4- Título: **Core-Shell magnetic silica nanoparticles modified with methoxy-PEG-b-PCL for theranostic applications**

Nombre del congreso: Surface Functionalization and Nanobiocomposites

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Szeged, Hungría

Fecha de realización: 20/05/2013

DAVID SERRANO RUIZ; PAULINO ALONSO CRISTOBAL; MARCO LAURENTI; ENRIQUE LOPEZ CABARCOS; BENITO JORGE RUBIO RETAMA.

5- Título: **Polymer Chain Diffusion in Interpenetrated Microgels with Upper Critical Solution Temperature**

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Ponencia

Ciudad de realización: Malmö, Suecia

Fecha de realización: 02/09/2012

ENRIQUE LOPEZ CABARCOS; BENITO JORGE RUBIO RETAMA; DAVID SERRANO RUIZ; MARCO LAURENTI.

6- Título: **Polymer Chain Diffusion in Interpenetrated Microgels with Upper Critical Solution Temperature**

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Ponencia

Fecha de realización: 24/06/2012

Ciudad: SEGOVIA, España

DAVID SERRANO RUIZ; MARCO LAURENTI; BENITO JORGE RUBIO RETAMA; ENRIQUE LOPEZ CABARCOS.

7- Título: **Hybrid microparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging**

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Berlín, Alemania

Fecha de realización: 04/09/2011

DAVID SERRANO RUIZ; JESÚS RUIZ CABELLO; ENRIQUE LÓPEZ CABARCOS; JORGE RUBIO RETAMA

8- Título: **Poly(ethyleneglycol- ϵ -caprolactone)@Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic resonance imaging and drug delivery system**

Tipo evento: Congreso Ámbito del congreso: Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Fecha de realización: 30/03/2011

Ciudad: MADRID, España

DAVID SERRANO RUIZ; JESÚS RUIZ CABELLO; ENRIQUE LÓPEZ CABARCOS; JORGE RUBIO RETAMA.



Core-Shell Magnetic Silica Nanoparticles Modified with methoxy-PEG-*b*-PCL for Theranostic Applications

David Serrano-Ruiz, Paulino Alonso-Cristóbal, Marco Laurenti, Enrique López-Cabarcos, Jorge Rubio-Retama
Department of Physical-Chemistry II, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain

Abstract

In this work we describe the synthesis, characterization and possible application, as lipophilic drugs solubilization, of hybrid core-shell magnetic silica nanoparticles based on Fe_3O_4 core covered with silica and biodegradable and biocompatible methoxy-polyethyleneglycol-*b*-poly- ϵ -caprolactone. The synthesis of the hybrid material was carried out using "grafting from" technique for poly- ϵ -caprolactone and "grafting to" for methoxy-polyethyleneglycol. The hybrid system was loaded with ethyl 2-amino-4,6-diphenylbenzoate, a very hydrophobic antitumoral-like substance, and was solubilized in water.

Introduction

The aim of this work is to create a hybrid system useful for theranostic applications which could be suitable for carrying poorly aqueous soluble drugs. In this way it could be possible to see the localization within the body of a drug after its administration, and to induce the drug release by melting the polycaprolactone using magnetic induction. Thus, it could be possible to minimize the secondary effects of the drug and maximize its medical activity.

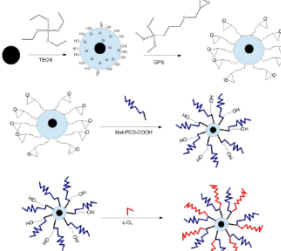
Experimental and Results

Synthesis of the Fe_3O_4 Nanoparticles.

Magnetic nanoparticles (MN) with 7nm diameter were synthesized using the Hyeon organic decomposition method. In a first step we prepare $\text{Fe}(\text{oleate})_3$ with 12,53g oleic acid and 3,6g FeCl_3 in a basic media and using hexane. In a second step 1,26g of $\text{Fe}(\text{oleate})_3$ is mixed with 7g octadecene and heated at 306°C. The resulting nanoparticles were dispersed in hexane.

Surface modification and Synthesis of met-PEG-*b*-PCL@ Fe_3O_4 nanoparticles.

A shell of silica was made by Stöber method, 240mg Igpeal were dissolved in 4.5mL Hexane, 0.2mg of MN, 40 μL Amonia and 30 μL TEOS were added. In order to anchoring methoxy-PEG, the surface of the core-shell MN-Silica nanoparticles was modified with glycidoxipropyl trimethoxysilane (GPS) adding 0.5mL to the previous particles. Later, a modified methoxy-PEG modified with succinic anhydride was anchored via *grafting* to opening the epoxy ring of the GPS. Methoxy-PEG was added in excess and heated at 60°C 24h. The epoxy ring opening provided hydroxyl groups useful to begin the polymerization of the ϵ -caprolactone. Taking into account the amount of methoxy-PEG anchored, various quantities of ϵ -caprolactone were used for the polymerization. We obtained ratios met-PEG:PCL 1:0.25; 1:0.5; 1:1; 1:2.



Scheme 1. This scheme shows the steps needed to synthesize the hybrid material.

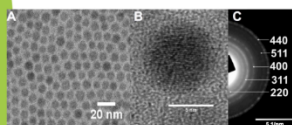


Figure 1. A,B) HRTEM pictures of the Fe_3O_4 magnetic nanoparticles. C) SAED pattern of the same nanoparticles.

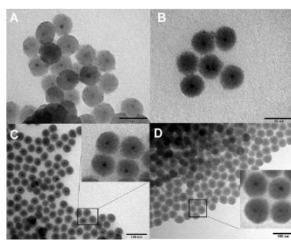


Figure 2. TEM pictures of the hybrid nanoparticles with different copolymer ratios: A) 1:0.25; B) 1:0.5; C) 1:1; D) 1:2. As we can observe, the amount of PCL increases on the surface. Insets in C and D show the polymer covering the particles.

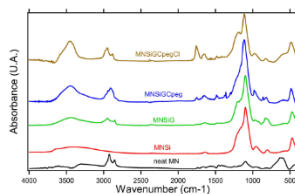


Figure 3. FTIR spectra showing the evolution of the synthesis of the hybrid system

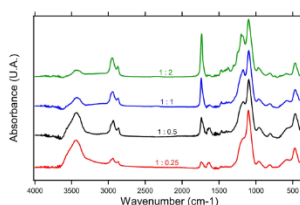
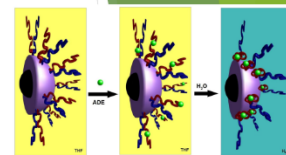


Figure 4. FTIR spectra showing the different amounts of PCL grafted from the surface of the hybrid nanoparticles. We can observe the peak at 1733 cm^{-1} from the C=O stretching band of the ester group increasing its intensity



Figure 5. ADE, ethyl 2-amino-4,6-diphenylbenzoate



Scheme 2. Schematic representation of the ADE loading into the hybrid system and its solubilization. ADE molecule (green ball) joins with PCL chains by hydrophobic interactions. When they are introduced in aqueous media, PCL chains collapse entrapping the ADE molecules while met-PEG chains solubilize the entire system.

ADE loading. Aliquot of the hybrid system with ratio 1:0.5 was dispersed in 2mL THF. 0.2mg of ADE was dissolved in the same media. Later, 6mL of water milliQ was added and the flask was sonicated 5 minutes. Subsequently the system was exposed to a 0.4T of magnetic field in order to separate the ADE loaded hybrid system.

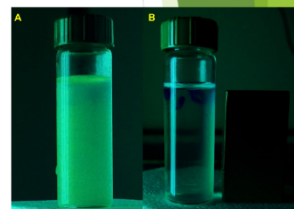


Figure 6. Pictures of the hybrid system loaded with ADE (A), and side-precipitated under a magnetic field (B); both with UV-lamp because of ADE is fluorescent and permits an easy visualization. Notice there is not any precipitated formed at the bottom of the flask.

Conclusions

- In this work we have prepared hybrid magnetic nanoparticles based on methoxy-PEG-*b*-PCL@Silica- Fe_3O_4 .
- The synthesis of this material was carried out using a *grafting from* and *grafting to* technique of conveniently modified magnetic nanoparticles with a shell of silica. Depending on the synthesis conditions it was possible to control the amount of polycaprolactone growth on the surface. This process was followed by TEM and FTIR.
- The hybrid material was used to load a very hydrophobic molecule. This molecule was dissolved in aqueous media thanks to the copolymer functionalization that entrapped the molecule and solubilized the system.
- The hybrid system loaded with the hydrophobic molecule responded to an external magnetic field, thus it is possible to be used like a theranostic system because of these properties above.

References

- 1-Nature Materials 3, 891 - 895 (2004); Park J, An K, Hwang Y, Park J, Noh H, Kim J, Park J, Hwang M, Hyeon T.
- 2-Adv Mater., 6:22(25):2729-42 (2010); Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S.
- 3-Accounts of Chemical Research; 44, 10, 1061-1070 (2011); Caldorera-Moore M, Liechty W, Peppas N.
- 4-J. Col. Int. Sci. 26, 62-69 (1968); Stöber W, Fink A, Bohn E
- 5- Chem. Soc. Rev., 38, 3484-3504 (2009); Labet M, Thielemans W

Poly(ethyleneglycol- ϵ -caprolactone)@Fe₃O₄ Microparticles for Magnetic Resonance Imaging

David Serrano-Ruiz, Jesús Ruiz-Cabello, Enrique López-Cabarcos, Jorge Rubio-Retama
Physical-Chemistry II Department, Pharmacy Faculty, Complutense University Madrid UCM.

Abstract

In this work we show the synthesis, characterization and application as contrast agent of hybrid magnetic microparticles based on Fe₃O₄ nanoparticles covered with a biodegradable and biocompatible poly(ethyleneglycol- ϵ -caprolactone). The synthesis of the hybrid material was carried out using "grafting from" technique of conveniently modified magnetic nanoparticles.

In order to give colloidal stability to the PCL@Fe₃O₄ nanoparticles, they were covered with a poly(ethyleneglycol) layer by co-precipitation technique. Thus hybrid magnetic microparticles with a mean size of 98 nm were obtained. With the aim of proving their suitability as contrast agent, R1 and R2 of the hybrid microparticles were measured using a bench-top nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometer. The hybrid microparticles were after that injected in rats and its localization was monitored within the animals.

Introduction

The aim of this work is to create a hybrid system useful for RMI, which could be suitable for carrying poorly aqueous soluble drugs. In this way it could be possible to administrate a drug to see the localization within the body and induce the drug release by magnetic induction, what can melt the polymer. Thus could be possible to minimize the secondary effects of the drug and maximize its medical activity.

Experimental and Results

Synthesis and Surface Modification of the Fe₃O₄ Nanoparticles.

Magnetic nanoparticles with 6.5 nm diameter were synthesized using the Massart coprecipitation method. A mixture of 8.6496 g of FeCl₂·6H₂O and 3.1213 g of FeCl₃·4H₂O were dispersed in 25 ml MilliQ-grade water and sonicated for 1 h. This solution with acidic pH was added dropwise into 250 ml of a solution NaOH 1.5 M, under N₂ atmosphere at 25 °C and stirred for 30 minutes.

After that the obtained nanoparticles were covered with citric acid with the aim of anchoring hydroxyl groups on the surface of the magnetic nanoparticles. These hydroxyl groups will serve as initiator during the ring opening polymerization of the ϵ -caprolactone. In order to do that the obtained magnetic dispersion was subjected to magnetic separation with a magnet, and the collected magnetic mud was then redispersed in 200 mL of trisodium citrate solution (0.3 M) and heated at 80 °C for 1 h. The magnetic nanoparticles were precipitated with acetone to remove the excessive citrate groups adsorbed on the nanoparticles, collected with a magnet, and stored.

Synthesis of PCL@Fe₃O₄ nanoparticles

The synthesis of the PCL@Fe₃O₄ was carried out via "grafting from" technique, which consisted in starting the ring-opening polymerization of the poly(ϵ -caprolactone) using the hydroxyl groups present on the surface of the Fe₃O₄ nanoparticles. For that 25 mg of citrate modified magnetic nanoparticles were dispersed in 50 ml of DMF at 90 °C under mechanical stirring and N₂ atmosphere. After one hour a catalytic amount of tin(II) trifluoromethane sulphate was added together with different volumes of ϵ -caprolactone. This reaction was maintained during 4 hours.

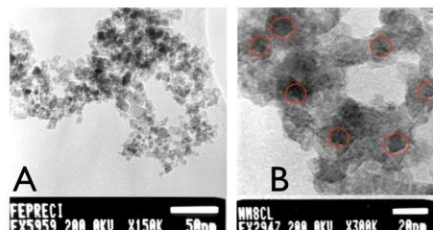


Figure 1 shows TEM pictures of the (a) as prepared Fe₃O₄ crystals. Here we can observe that the most of the nanoparticles present a size close to 6 nm. b) PCL@Fe₃O₄ nanoparticles. The PCL polymerization around the modified Fe₃O₄ creates a hybrid material based on Fe₃O₄ nanoparticles covered with a thick PCL layer. The red circles indicate the position where Fe₃O₄ crystals were found within the sample.

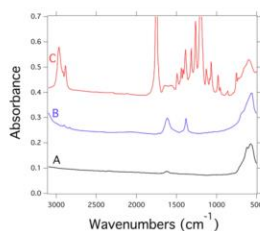


Figure 2. FT-IR spectra of (a) the as synthesized, (b) trisodium citrate treated (c) PCL@Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. The presence of two strong absorption bands at 1618 and 1400 cm⁻¹ in the spectra of the citrate modified magnetic nanoparticles confirm the complexation of citric acid on the surface of the nanocrystals. The polymerization reaction around the magnetic nanoparticles was confirmed by the presence of an strong band at 1733 cm⁻¹ which is representative of the C=O carbonyl stretching of these polyesters.

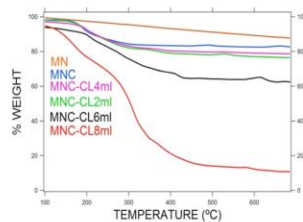


Figure 3. Loss of weight obtained from (MN) neat Fe₃O₄, (MNC) citrate modified Fe₃O₄ and (MNC-CL) different PCL@Fe₃O₄. The graph shows an increment of the loss of weight when the ratio of monomer respect the magnetic nanoparticles is increased. Thus for polymerization reaction carried out with the lowest amount of ϵ -caprolactone the polymer growth around the nanoparticles was around 5%, by contrast when the monomer used during the polymerization was in excess the polymer growth around the nanoparticles was around 62%.

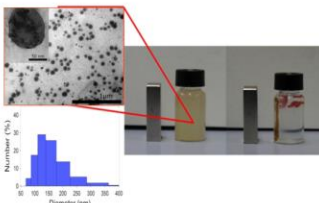


Figure 4. (A) TEM image of hybrid microparticles obtained by precipitation technique. (B) Aqueous dispersion of hybrid microparticles and its response to a constant magnetic field of 0.3 T. (C) Size distribution of the hybrid microparticles in water measured by DLS.

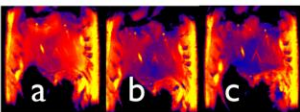


Figure 5. Imaging Magnetic Resonance picture obtained after injecting a hybrid microparticles dispersion in rats (the blue color indicates the accumulation). Here we can observe the liver uptake of the hybrid microparticles at different times. a) 0 min, b) 5 min and c) 60 min.

Conclusions

- In this work we have prepared hybrid magnetic microparticles based on PEG@PCL@Fe₃O₄.
- The synthesis of this material was carried out using a grafting from technique of conveniently modified magnetic nanoparticles. Depending on the synthesis conditions it was possible to control the amount of polymer growth on the surface.
- The hybrid material was used to prepare magnetic microparticles using the precipitation technique.
- The obtained microparticles presented a hydrodynamic diameter of 98 nm and responded to a constant magnetic field.
- This microparticle dispersion was after that injected in rats and its localization was followed during one hour by MRI. The results indicate that after this time the hybrid material begins to be accumulated in the liver.
- The resulting system is envisaged to be used as drug delivery system for poorly soluble molecules, which would be loaded within the PCL matrix.

References

- 1 R. Asmatulu, M.A. Zalich, R.O. Claus, J.S. Riffle, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 292 (2005) 108, 119-10.
- 2 Lu, Z. H.; Prouty, M. D.; Guo, Z. H.; Golub, V. O.; Kumar, C. S. S. R.; Lvov, Y. M. Langmuir 2005 21 5 2042.
- 3 Huh, Y.-M.; Jun, Y.-W.; Song, H.-T.; Kim, S.; Choi, J.-S.; Lee, J.-H.; Yoon, S.; Kim, K.-S.; Shin, J.-S.; Suh, J.-S.; Cheon, J. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 12387.
- 4 Na, H. B.; Lee, J. H.; An, K.; Park, Y. I.; Park, M.; Lee, A. S.; Nam, D.-H.; Kim, S. T.; Kim, S.-H.; Kim, S.-W.; Lim, K.-H.; Kim, K.-S.; Kim, S.-O.; Hyeon, T. Angew. Chem., Int. Ed. 2007, 46, 5397.

Synthesis and Chemical Modification of Magnetic Nanoparticles Covalently Bound to Polystyrene-SiCl₂-Poly(2-vinylpyridine)

DAVID SERRANO-RUIZ,¹ SOFIA RANGOU,² APOSTOLOS AVGEROPOULOS,² NIKOLAOS E. ZAFEIROPOULOS,² ENRIQUE LÓPEZ-CABARCOS,¹ JORGE RUBIO-RETAMA¹

¹Pharmacy Faculty, Physical-Chemistry Department, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²Department of Materials Science & Engineering, University of Ioannina, Ioannina 45110, Greece

Received 9 October 2009; revised 14 April 2010; accepted 15 April 2010

DOI: 10.1002/polb.22049

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ABSTRACT: The present article offers a new approach to create a multifunctional material based on magnetic nanoparticles, which can be dispersed in aqueous and organic media. The preparation of this material was performed by binding covalently polymer chains based on a reactive diblock-copolymer of the polystyrene-SiCl₂-poly(2-vinylpyridine) type, with average molecular weight per number (M_n) equal to 14,700 g/mol and a polydispersity index (PDI) less than 1.1, onto the surface of γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. The dichlorosilane moiety of the diblock-copolymer reacted with the —OH groups of the magnetic nanoparticles immobilizing the polymer chain onto its surface. This reaction was monitored by FTIR and the

polymer grafting density was determined by TGA and BET. Dynamic light scattering revealed that the hydrodynamic diameter of the nanoparticles increased after immobilizing the polymer. Contact angle measurements demonstrated the ability of the hybrid material to interact with organic and aqueous media allowing its dispersion in solvents with different polarities. This property was used to prepare a magnetically active emulsion. © 2010 Wiley Periodicals, Inc. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 48: 1668–1675, 2010

KEYWORDS: diblock copolymers; hybrid materials; hyperbranched; magnetic nanoparticles; nanoparticles

INTRODUCTION Inorganic materials conspicuously change their properties by decreasing their size to the nanoscale as is the case with quantum dots that offer the possibility to tune the bandgap, and hence, the emission wavelength.^{1–4} For example, gold nanoparticles change the absorbance of the surface plasmon from ultraviolet wavelength in macroscopic gold to visible in the nanoparticles.⁵ In the case of magnetic materials, the size reduction leads to changes in their magnetic behavior that may result in superparamagnetism. Thus, iron oxide particles constituted by multiple magnetic domains can become superparamagnetic if their size is reduced in such a way that there is only one magnetic domain per nanoparticle.⁶ Superparamagnetic nanoparticles can be guided in a magnetic field, and when the field is switched off the magnetization disappears and the particles become magnetically inactive, while for ferromagnetic ones this is not the case. These nanoparticles are of interest in the preparation of ferrofluids since their small size allows an excellent dispersion in liquids.

One of the major advantages of nanoparticles is their high specific surface, while perhaps their major drawback is their lack of stability that leads to aggregation and precipitation. A common way to prevent aggregation is by functionalizing the

nanoparticle surface with polymers which can stabilize the system with steric impediments.^{7–10} Moreover, the nanoparticle with its polymer shell constitutes a hybrid system that mixes the properties of both components. Thus, it is possible to prepare nanoparticles with simultaneous hydrophilic and lyophobic properties using amphiphilic copolymers with a hydrophilic and a lyophobic block. The most interesting of these copolymers possess surfactant properties and they can self assemble forming micelles and liquid-crystalline structures. The combination of these properties with those of the magnetic nanoparticle at the core could lead to magnetic surfactants that can be used to prepare emulsions reactive to external magnetic fields. These materials could find applications in medicine and pharmacology like carriers of proteins, DNA,¹¹ peptides, hormones, antitumor agents,^{12–14} as image diagnostic tools,¹⁴ and biosensors.^{15–17}

The aim of the present work was to synthesize magnetic nanoparticles with surfactant properties. For that, an amphiphilic diblock copolymer was covalently bound to the nanoparticles' surface with the purpose of providing them with miscibility in organic and aqueous solvents, as well as with steric impediments that prevent aggregation. The surface of γ -Fe₂O₃ nanoparticles of 10 nm diameter was modified with

Einem großen Freund und wunderbaren Mentor gewidmet anlässlich seines 60. Geburtstages. Unser Chef, mensch, mit sechzig bist Du noch jung, schön Geburtstag!

Correspondence to: J. Rubio-Retama (E-mail: bjrubio@farm.ucm.es) or N. E. Zafeiropoulos (E-mail: nzafiro@cc.uoi.gr)

Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, Vol. 48, 1668–1675 (2010) © 2010 Wiley Periodicals, Inc.

a specific diblock copolymer of polystyrene-SiCl₂-poly(2-vinylpyridine) (abbreviated from here on as PS-*b*-P2VP) and a magnetic emulsion was prepared with the new surfactant.

EXPERIMENTAL

Materials

The iron chloride precursors (FeCl₃·6H₂O and FeCl₂·4H₂O) were purchased from Panreac. The monomers (styrene and 2-vinylpyridine), initiator (*sec*-BuLi), polymerization solvent (THF), and the linking reagent (tetrachlorosilane or SiCl₄) were purified according to literature and more details are given elsewhere.¹⁸ Hydrogen chloride and sodium hydroxide (Panreac), were purchased with maximum purity and used without further purification. A commercial magnet of NdFeB with a magnetic field of 0.4 T was purchased from www.supermagnete.de.

Synthesis of the Diblock Copolymer

The block copolymer exhibiting middle active —Cl groups of the PS-SiCl₂-P2VP type was synthesized using anionic polymerization in combination with chlorosilane chemistry.¹⁹ All glassware manipulations were arranged according to the reactions necessary and the polymerization procedures and/or substitutions of chlorine atoms were performed through the break-seal approach. The living anionic polymerization of styrene is considered a trivial procedure, but the polymerization of a monomer such as 2-vinylpyridine containing functional groups is not straightforward due to the side reactions by the strong reactivity of the carbanion.²⁰ The preparation of the materials can be divided in three steps. First, the PS⁽⁻⁾Li⁽⁺⁾ chains are prepared in ~1 h via anionic polymerization of styrene, using *sec*-BuLi as initiator, with THF at -78 °C as solvent, followed by the substitution of the Li⁽⁺⁾ using large excess (1000:1) of tetrachlorosilane (SiCl₄). After complete substitution of only one chlorine atom from the living ends, the excess of the SiCl₄ is removed through the high vacuum line as described in the literature¹⁹ leaving only the intermediate product of the PS-SiCl₃ type. The third step is the initiation of anionic polymerization of 2VP through *sec*-BuLi in THF at -78 °C in another polymerization apparatus. Before completion of the polymerization, two monomeric units of styrene are added in the system to avoid back-biting reactions due to the nitrogen atom of the aromatic pyridine group being adjacent to the lithium cation. The incorporation of the styrene modified P2VP⁽⁻⁾Li⁽⁺⁾ chains is performed by a titration reaction to selectively substitute only one of the three remaining chlorine atoms of the PS-SiCl₃ intermediate product, leading to the final PS-SiCl₂-P2VP diblock copolymer (or as mentioned above PS-*b*-P2VP) with a ratio of PS and P2VP chains of 1:1. In all cases THF was used as the solvent since it is considered a nonselective solvent for both segments (PS and P2VP, respectively).

Synthesis of Magnetic Nanoparticles

Magnetic nanoparticles with 10 nm diameter were synthesized using the Massart coprecipitation method.¹⁸ A mixture of 8.6496 g of FeCl₃·6H₂O and 3.1213 g of FeCl₂·4H₂O were dispersed in 25 mL MilliQ-grade water and sonicated for 1 h. This solution with acidic pH was added dropwise into

250 mL of a solution NaOH 1.5 M, under N₂ atmosphere, and stirred for 30 min. The sudden change in the pH affects the iron ion solution leading to precipitation as small iron oxide crystals. Depending on the Fe⁺³ and Fe⁺² ratios, different iron oxides could be obtained (magnetite, maghemite, and hematite). In addition with the aim of obtaining nanoparticles with different size, the synthesis temperature was varied from 25 to 80 °C. Magnetic nanoparticles were separated via magnetic decantation and washed with distilled water, a process which was repeated at least for three times.

Synthesis of Surfactant-Magnetic Nanoparticles

PS-SiCl₂-P2VP (5 g) were dissolved in extra dry THF and poured in a flask containing 75 mg of magnetic nanoparticles. The mixture was left to react for 5 days under sonication. Once the reaction was complete, the nanoparticles were centrifuged at 21.000 rpm in THF for 3 h, and subsequently, the supernatant was decanted. This operation was repeated five times. The resulting product was lyophilized and analyzed.

Methods of Characterization

X-ray diffraction measurements were performed using a Philips X'Pert PW3050 diffractometer. The diffractograms were recorded in reflection mode using a 2θ interval between 1.5 and 35, recording at 0.01° steps per second with an estimated error in the reflection positions of ±0.2°. Silicon powder was used to calibrate the sample to detector distance. The temperature of the samples was measured with a precision of ±3 °C.

The size and morphology of the nanoparticles were measured with a JEOL JSM-2100 electron microscope working at 200 KV. Micrographs were recorded with a magnification between ×1500 up to ×6000. TEM grids were prepared drop cast technique.

Infrared measurements were recorded using a Nicolet IR200 spectrometer. Samples were analyzed using potassium bromide tablets enriched with 2% up to 5% nanoparticles.

The nanoparticles' hydrodynamic diameter was measured using a Malvern-NanoZS system equipped with a He-Ne laser working at 633 nm and a Peltier for temperature control. The contact angle measurements were carried out using a video camera connected to a goniometer.

The composition of the samples was determined using a Mettler TGA-DSC1. The measurements were performed in a temperature range between 25 °C and 700 °C under oxygen atmosphere to ensure that all organic compounds in the sample were totally decomposed.

Magnetization was measured using a SQUID class MPMS from Quantum Design working at 25 °C and scanning magnetic fields between -5 T and 5 T.

The specific surface of the magnetic nanoparticles was calculated from the Brunauer, Emmett, and Teller Isotherm method (BET) measured with a porosimeter Micrometrics ASAP 2020 version 3.00.

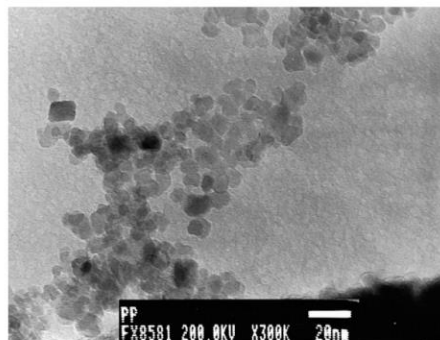


FIGURE 1 TEM micrograph of magnetic nanoparticles synthesized at 80 °C, with 10 nm average diameter.

RESULTS

Characterization of the Magnetic Nanoparticles

The Massart coprecipitation carried out at different temperatures produced ferrofluids consisting of magnetic nanoparticles with different hydrodynamic diameters ranging from 5 nm to 10 nm. Figure 1 shows a TEM micrograph of magnetic nanoparticles synthesized at 80 °C.

The variation of temperature during the synthesis leads to variation on hydrodynamic diameters of the magnetic nanoparticles. Figure 2 represents the hydrodynamic diameter of

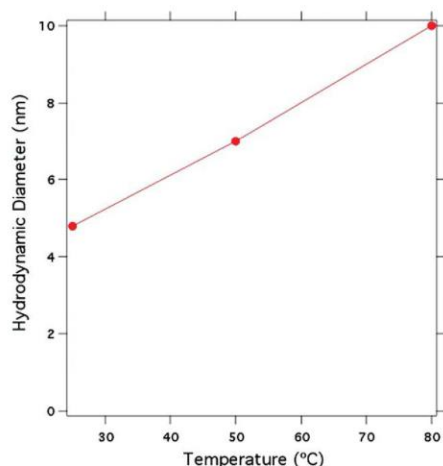


FIGURE 2 Hydrodynamic diameters of the magnetic nanoparticles obtained by dynamic light scattering as a function of the synthesis temperature.

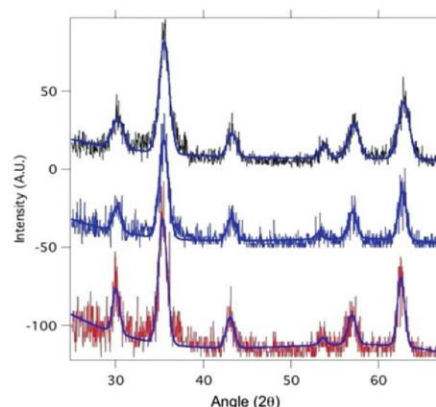


FIGURE 3 X-Ray diffraction patterns of the magnetic nanoparticles with different size; red (10 nm diameter), blue (7 nm diameter), and black (5 nm diameter).

the synthesized nanoparticles obtained by dynamic light scattering as a function of the synthesis temperature.

It can be observed that the increment of the synthesis temperature leads to an increase of the nanoparticles' hydrodynamic diameter as it was reported by other authors.^{21–23} This result agrees well with the nucleation and crystallization theory which predicts an increment of the crystal size when the synthesis temperature is increased. However, independent of the size, the magnetic nanoparticles present a crystalline structure which was studied by X-Ray diffraction. The diffraction patterns of magnetic nanoparticles with different size are presented in Figure 3. The *d*-spacing of the reflections was calculated using the Bragg equation:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

where $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$ is the X-ray wavelength and θ is the scattering angle. All detected diffraction peaks (see Table 1) are attributed to cubic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ phase (maghemite) or cubic Fe_3O_4 (magnetite). The Rietveld analysis showed that the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ phase represents 93% of the crystalline contribution being the cubic Fe_3O_4 phase 7%. Furthermore, the calculated lattice parameter was found equal to $8.33 \pm 0.04 \text{ \AA}$ which is far closer to the lattice parameter of maghemite (8.351 \AA), than that of magnetite (8.396 \AA). These results strongly indicate that the main crystalline phase of the synthesized nanoparticles can be identified as the cubic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ phase.

TABLE 1 Position, *d*-Spacing, and Miller Indices of the Reflections

2θ (°)	30.34	35.65	43.54	53.82	57.54	63.02
<i>d</i> (Å)	2.944	2.517	2.078	1.702	1.601	1.474
(<i>hkl</i>)	(220)	(311)	(400)	(422)	(511)	(404)

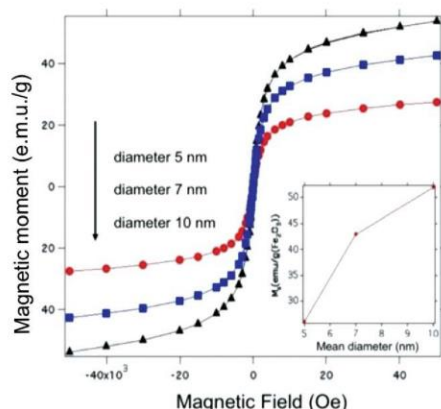


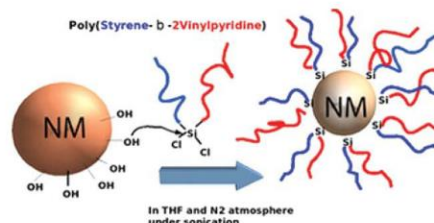
FIGURE 4 Magnetic moment of γ - Fe_2O_3 nanoparticles with different size versus magnetic field.

One of the most important characteristics of magnetic nanoparticles is their magnetic moment which eventually determines their potential use. The magnetic properties were determined using the SQUID technique and the results are shown in Figure 4. One can observe the absence of hysteresis which at low field is the signature of ferromagnetic behavior, thus suggesting that each nanoparticle has only one magnetic domain, and hence, exhibits superparamagnetism. It is also worth to note that the nanoparticles' magnetic moment do not fully saturate at high field as is indicated by the absence of a clear plateau. The inset in Figure 4 shows the dependence of the maximum value of the magnetic moment as a function of the nanoparticle diameter. This is attributed to surface phenomena associated with the small size of the nanoparticles and their high specific surface. This result points to the conclusion that magnetic nanoparticles with 10 nm in diameter exhibit the highest magnetic moment, and for this reason, they were used as the inorganic core in the preparation of the hybrid material.

Characterization of the Surfactant-Magnetic Nanoparticles

To provide the nanoparticles with surfactant behavior, we have carried out a modification on their surface immobilizing PS-*b*-P2VP ($M_n = 14,700$ g/mol, PDI = 1.04). This copolymer has a dichlorosilane group (Cl-Si-Cl) between both blocks which is reactive towards the hydroxyl groups on the surface of the iron oxide (see Scheme 1) resulting to the covalent attachment of the copolymer on the nanoparticles.

The immobilization of the diblock copolymer on the nanoparticles surfaces was verified using FTIR spectroscopy and the results are shown in Figure 5.



SCHEME 1 Representation of the nanoparticles surface functionalization with the diblock copolymer.

The FTIR spectrum of pure γ - Fe_2O_3 nanoparticles exhibits three characteristic peaks at 3400 cm^{-1} , 637 cm^{-1} , and 572 cm^{-1} attributed to the hydroxyl groups on the nanoparticles surface, the Fe-O-Fe and Fe-OH bonds, respectively.²⁴ It can be seen in Figure 5, that the FTIR spectrum of the pure copolymer is similar to that of the surfactant-magnetic nanoparticles with absorbance bands at 698, 752, 788, 1436, 1477, 1594, and 3030 cm^{-1} characteristics of poly(styrene)-copoly(2-vinylpyridine). Furthermore, we have tried to adsorb the same diblock-copolymer without the silane reactive group onto the surface of the maghemite and the FTIR results showed that cleaning yields magnetic nanoparticles without copolymer. These results confirm the functionalization of the nanoparticles with the diblock copolymer.

The TEM micrograph in Figure 6 shows the polymer disposition around the magnetic nanoparticles, where it is easily observed that a polymer corona of PS-*b*-P2VP surrounds the magnetic nanoparticles.

The polymer corona swells in appropriate solvents like THF increasing the hydrodynamic diameter of the hybrid nanoparticles. Figure 7 shows the hydrodynamic diameter of the

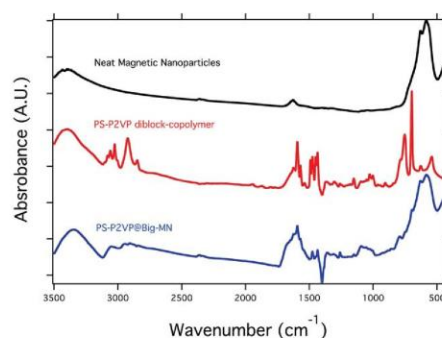


FIGURE 5 Infrared spectra (a) γ - Fe_2O_3 magnetic nanoparticles without modification (black), (b) diblock copolymer poly(styrene)-*b*-poly(2-vinylpyridine) (red), and (c) γ - Fe_2O_3 magnetic nanoparticles functionalized (blue).

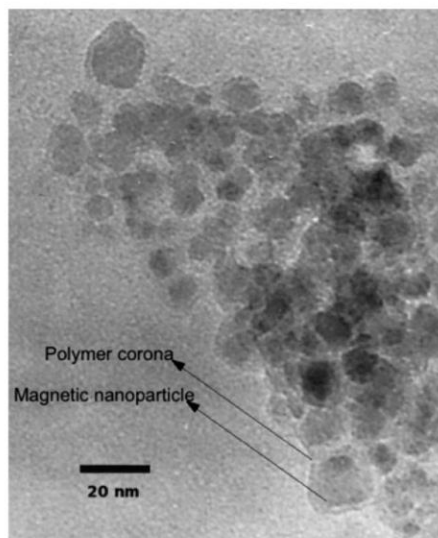


FIGURE 6 TEM micrograph of magnetic nanoparticles with 10 nm diameter covered with diblock copolymer.

magnetic nanoparticles measured by dynamic light scattering (DLS) before and after their surface was functionalized with the diblock copolymer.

As can be seen in Figure 7, the functionalized nanoparticles' hydrodynamic diameter increases from 10 nm to 34 nm, which is a reasonable increment considering that the polymer average molecular weight per number (M_n) is $\sim 14,700$ g/mol. On the other hand, DLS measures the hydrodynamic

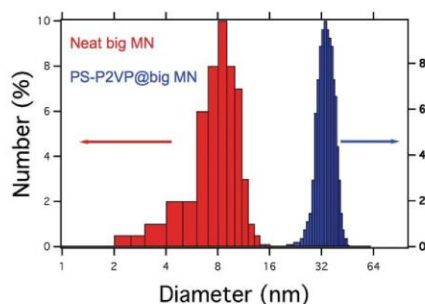
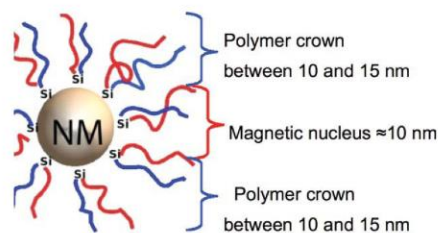


FIGURE 7 Diameter of the nanoparticles before (red) and after (blue) functionalization. The measurements were carried out in THF that is a good solvent for both polystyrene and poly(2-vinylpyridine).



SCHEME 2 Arrangement of the copolymer on the surface of the magnetic nanoparticle.

diameter resulting from the size of the inorganic core and the polymer corona that swells in a good solvent increasing the nanoparticles diameter. By contrast, at the high vacuum condition of the TEM the magnetic nanoparticles are surrounded by a thin layer of the collapsed polymer and therefore their diameters are smaller than the 34 nm observed by DLS. Scheme 2 represents the arrangement of the copolymer around the nanoparticle and the estimated thickness of each layer.

In addition, thermogravimetric measurements were carried out to evaluate the amount of copolymer immobilized on the nanoparticles surface, and to quantitatively estimate the number of copolymer chains attached to the nanoparticles surface (see Fig. 8).

As can be seen in Figure 8, the weight loss of pure $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles is around 10% at 700 °C. Similar weight loss has been previously observed by other authors^{25–27} and is attributed to dehydration of the hydroxyl groups on the nanoparticles surface. Thus, the 20% weight loss of the functionalized $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles is explained by the

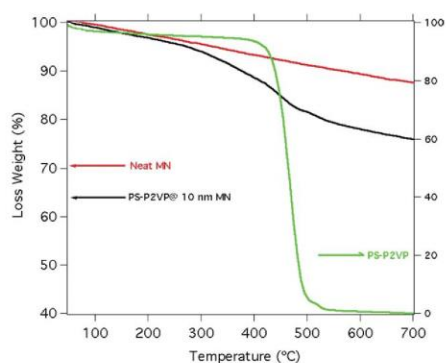


FIGURE 8 Thermogravimetric analysis of: (a) neat $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles (red), (b) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles functionalized (black), and (c) diblock copolymer poly(styrene)-copoly(2-vinylpyridine) (green).

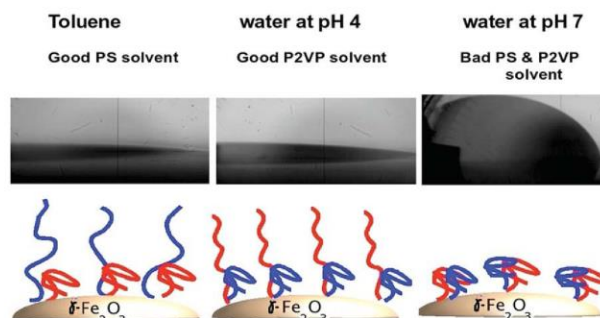


FIGURE 9 The upper panel shows photographs of different solvents on a film prepared with functionalized magnetic nanoparticles: (a) toluene, (b) water at pH 4, and (c) water at pH 7. The scheme at the bottom of the figure illustrates the corresponding arrangement of the copolymer chains.

dehydration of the hydroxyl groups together with an additional weight loss due to the copolymer decomposition.

The specific area of the surfactant-magnetic nanoparticles was measured with BET and the result was found to be 93 m²/g. Then, the number density of chains is obtained from the following equation:

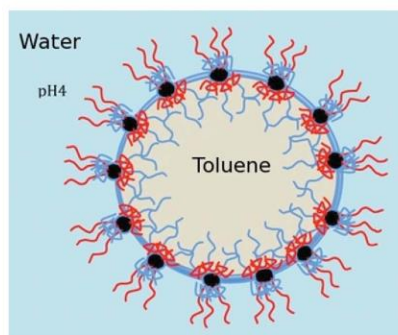
$$\rho(\text{chains/nm}^2) = \frac{\Delta \text{weight}(\frac{\text{g}}{\text{g}_{\text{MN}}}) \times 6.022 \cdot 10^{23}}{M_{\text{Wpolymer}} \times S_{\text{BET}}(\frac{\text{nm}^2}{\text{g}_{\text{MN}}})} \quad (2)$$

where $\rho(\text{chains/nm}^2)$ is the immobilized polymer chains density, Δweight is the weight loss due to the organic material decomposition, M_{Wpolymer} is the molecular weight of the polymer equal to 14,000 g/mol, and S_{BET} is the specific area of a gram of particles measured through BET. From the above expression we get a chain density of 0.046 chains/nm². Assuming the magnetic nanoparticles are spheres of 10 nm diameter, we calculate an average of 15 chains immobilized per nanoparticle.

This copolymer was chosen due to its selective miscibility in different solvents for the two blocks. For example, polystyrene is miscible in toluene but immiscible in slightly acid water, whereas poly(2-vinylpyridine) is immiscible in toluene but miscible in water at pH = 4. In a mixture of toluene–water the blocks are positioned in such a way where most of the polystyrene blocks are oriented towards the organic phase whereas the poly(2-vinylpyridine) blocks are oriented towards the aqueous phase allowing the creation of an emulsion with the magnetic nanoparticles at the interface. For this reason, the amphiphilic nature of these nanoparticles was investigated by measuring the contact angle of a film prepared with the functionalized magnetic nanoparticles in the presence of toluene (good solvent for polystyrene), water at pH = 4 [good solvent for poly(2-vinylpyridine)], and water at pH = 7 (bad solvent for both polymers). Figure 9 shows the drop profile and a scheme, based in articles of Stamm and coworkers,^{28–30} of the

possible arrangement of the polymer chains depending on the solvent used.

The contact angles obtained for the hybrid nanoparticles were 7.4° for toluene, 7.1° for water at pH = 4, and 76.6° for water at pH = 7. These values are very different from those measured for the iron nanoparticles without polymer: 32° for toluene, 15° for water at pH = 4, and 20° for water at pH = 7. As can be seen from Figure 9, in toluene the polystyrene chains expand whereas the poly(2-vinylpyridine) chains collapse. The situation reverses in the case of water at pH = 4. However, with water at pH = 7 both polymer chains collapsed decreasing the wetting. This result shows that the immobilized diblock copolymer provides amphiphilic character to the nanoparticles. This property was used to prepare a magnetic o/w emulsion of toluene in water at pH = 4. As is illustrated in Scheme 3, the magnetic



SCHEME 3 Schematic representation of a toluene drop emulsified in water at pH 4 due to the functionalized magnetic nanoparticles (black) with the copolymer polystyrene (blue) and poly-2-vinylpyridine (red).

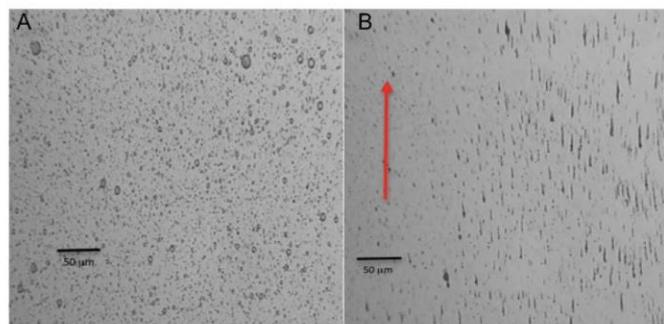


FIGURE 10 Optical microscopy images of a toluene in water (pH 4) emulsion stabilized with functionalized magnetic nanoparticles: (A) Emulsion droplets in absence of magnetic field and (B) emulsion droplet aligned in presence of an external magnetic field. The red arrow indicates the field direction.

nanoparticles will remain at the drop interface with the polystyrene chains extended towards the toluene and the poly-(2-vinylpyridine) chains towards the aqueous phase, thus, stabilizing the emulsion.

The left part in Figure 10 shows an optical microscopy image of the toluene in water at pH = 4 emulsion stabilized with the surfactant nanoparticles. As is shown in the right part of Figure 10, under an external magnetic field the emulsion droplets become somewhat distorted and aligned in the direction of the field.

In the emulsion prepared with the functionalized magnetic nanoparticles the droplets present an intense dark interface indicating that most of the nanoparticles are situated at the toluene water interface. These results illustrate how the surfactant-magnetic nanoparticles can be used to stabilize emulsions and provide them with structure in the presence of a magnetic field.

CONCLUSIONS

We have synthesized magnetic nanoparticles with a size of ~10 nm. These magnetic nanoparticles have been functionalized with an amphiphilic diblock copolymer of the PS-*b*-P2VP type (or PS-SiCl₂-P2VP) contributing to their colloidal stability and giving them selected miscibility properties. The magnetic nanoparticles and the functionalized magnetic nanoparticles have been characterized, whereas their composition and properties were also investigated. The surfactant-magnetic nanoparticles have been used to prepare an emulsion in which the emulsion droplets become oriented under external magnetic field.

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (MAT2009-14234) and the BSCH-UCM program for research groups (GR58/08). Partial support of COST Action D43 is also acknowledged.

REFERENCES AND NOTES

- 1 Chithrani, D.; Ghazani, A.; Warren, C. W. *Nano Lett* 2006, 6, 662–668.
- 2 Wang, Y.; Wong, J. F.; Teng, X.; Zhang Lin, X.; Yang, H. *Nano Lett* 2003, 3, 1555–1559.
- 3 Fornara, A.; Johansson, P.; Petersson, K.; Gustafsson, S.; Qin, J.; Olsson, E.; Ilver, D.; Krozer, A.; Muhammed, M.; Johansson, C. *Nano Lett* 2008, 8, 3423–3428.
- 4 Agrawal, M.; Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Gaponik, N.; Gupta, S.; Cimrova, V.; Lesnyak, V.; López-Cabarcos, E.; Tzavalas, S.; Rojas-Reyna, R.; Eychmüller, A.; Stamm, M. *Langmuir* 2008, 24, 9820–9824.
- 5 Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. *J Phys Chem C* 2008, 112, 4954–4960.
- 6 Nagarajan, R. *ACS Symp Ser* 2008, 996, 2–14.
- 7 Young Park, J.; Sook Choi, E.; Ju Baek, M.; Lee, G. H. *Mater Lett* 2009, 63, 379–381.
- 8 Zhu, A.; Yuan, L.; Liao, T. *Int J Pharm* 2008, 350, 361–368.
- 9 Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Serafinelli, C.; Rojas-Reyna, R.; Voit, B.; López-Cabarcos, E.; Stamm, M. *Langmuir* 2007, 23, 10280–10285.
- 10 Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Frick, B.; Seydel, T.; López-Cabarcos, E. *Langmuir* 2010, 26, 7101–7106.
- 11 Hinrichs, W. L. J.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van de Wetering, P.; Hennink, W. E. *J Control Release* 1999, 60, 249–259.
- 12 Yezhelyev, M. V.; Gao, X.; Xing, Y.; Al-Hajj, A.; Nie, S.; M O'Regan, R. *Oncol L* 2006, 7, 657–667.
- 13 Zhu, A.; Yuan, L.; Jin, W.; Dai, S.; Wang, Q.; Xue, Z.; Qin, A. *Acta Biomater* 2009, 5, 1489–1498.
- 14 Fortina, P.; Kricka, L. J.; Graves, D. J.; Park, J.; Hyslop, T.; Tam, F.; Halas, N.; Surrey, S.; Waldman, S. A. *Trends Biotechnol* 2007, 25, 145–152.

- 15 Liu, Z.; Liu, Y.; Yang, H.; Yang, Y.; Shen, G.; Yu, R. *Anal Chim Acta* 2005, 533, 3–9.
- 16 Nam, J.; Taxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* 2003, 301, 1884–1886.
- 17 Lu, M.; Ibraimi, F.; Kriz, D.; Kriz, K. *Biosens Bioelectron* 2006, 21, 2248–2254.
- 18 Massart, R. *IEEE Trans Magn* 1981, 17, 1247–1248.
- 19 Uhrig, D.; Mays, J. W. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2005, 43, 6179–6222.
- 20 Kadhum, A. A.; Sebo, N. H.; Jabrael, F. H.; Ibraheim, A. H. *J Thermal Analysis* 1992, 38, 2359–2367.
- 21 Yan, H.; Zhang, J.; You, C.; Song, Z.; Yu, B.; Shen, Y. *Mater Chem Phys* 2009, 113, 146–152.
- 22 Qu, Y.; Yang, H.; Yang, N.; Fan, Y.; Zhu, H.; Zou, G. *Mater Lett* 2006, 60, 3548–3552.
- 23 Maaz, K.; Karim, S.; Mumtaz, A.; Hasanain, S. K.; Liu, J.; Duan, J. L. *J Magn Magn Mater* 2009, 321, 1838–1842.
- 24 Zboril, R.; Bakandritsos, A.; Mashlan, M.; Tzitzios, V.; Dallas, P.; Trapalis, C.; Pedridis, D. *Nanotechnology* 2008, 18, 95602–95610.
- 25 Garcia, I.; Zafeiropoulos, N. E.; Janke, A.; Tercjak, A.; Eceiza, A.; Stamm, M.; Mondragon, I. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2007, 45, 925–932.
- 26 Garcia, I.; Tercjak, A.; Zafeiropoulos, N. E.; Stamm, M.; Mondragon, I. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2007, 45, 4744–4750.
- 27 Motornov, M.; Sheparovych, R.; Lupitsky, R.; MacWilliams, E.; Luzinov, O.; Hoy, I.; Minko, S. *Adv Funct Mater* 2007, 17, 2307–2314.
- 28 Synytska, A.; Ionov, L.; Dutschk, V.; Stamm, M.; Grundke, K. *Langmuir* 2008, 24, 11895–11901.
- 29 Houbenov, N.; Minko, S.; Stamm, M. *Macromolecules* 2003, 36, 5897–5901.
- 30 Sidorenko, A.; Minko, S.; Schenk-Meuser, K.; Duschner, H.; Stamm, M. *Langmuir* 1999, 15, 8349–8355.

Hybrid microparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging

David Serrano-Ruiz,¹ Marco Laurenti,¹ Jesús Ruiz-Cabello,^{1,2,3} Enrique López-Cabarcos,¹ Jorge Rubio-Retama¹

¹Department of Physical Chemistry II, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain

²Ciber of Respiratory Diseases, Spain

³Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

Received 21 February 2012; revised 8 June 2012; accepted 7 July 2012

Published online 22 August 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.32792

Abstract: In this work, we report the synthesis, characterization, and possible application as drug-delivery system magnetically triggered, of hybrid microparticles formed by magnetic nanoparticles embedded within poly(ϵ -caprolactone). The magnetism of the microparticles permits their localization within the body using magnetic resonance imaging, and the biodegradable polymer layer allows entrapping drugs that can be released when temperature increases. The synthesis of the hybrid material was performed using “grafting from” technique of conveniently modified magnetic nanoparticles. Subsequently, the resulting hybrid nanoparticles were assembled into spherical particles of 138 ± 49 nm

via precipitation technique. The produced hybrid material was evaluated as stimuli-responsive drug delivery system in which the release of the drug was triggered by magnetic induction. Furthermore, the microparticles were injected in rats and their localization within the animal was monitored using the local field inhomogeneities generated by the particles. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 101B: 498–505, 2013.

Key Words: hybrid microparticles, magnetic nanoparticles, biocompatible polymer, drug delivery system, magnetic resonance imaging, poly(ϵ -caprolactone)

How to cite this article: Serrano-Ruiz D, Laurenti M, Ruiz-Cabello J, López-Cabarcos E, Rubio-Retama J. 2013. Hybrid microparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging. *J Biomed Mater Res Part B* 2013;101B:498–505.

INTRODUCTION

One promising application of magnetic nanoparticles is in therapeutics and diagnosis, because magnetic properties can be used to concentrate in a specific tissue the medicament, to reveal its position within the body by magnetic resonance imaging (MRI) and to trigger the release of the drug by means of an alternant magnetic field.^{1–3} These amazing capacities have prompted scientist to look for different strategies that would permit to develop these smart drug delivery systems that respond to magnetic fields.⁴ The fact of targeting the tissue with the drug and to start its release in a controlled way would reduce conspicuously toxic side effects that are common in cancer treatments.^{5–11}

Concerning the ways to release a drug by applying an alternant magnetic field, one can find two different methods. One of the approaches has been named as hyperthermia-based controlled drug delivery through bond breaking. In this mechanism, the drug molecule, which is attached to the system by a thermal sensitive bond, is released when the linker molecule breaks under heating.¹²

A second mechanism named hyperthermia-based controlled drug delivery through enhanced permeability is also used. Within this strategy, we can find some articles that modulate the drug release by the formation of cracks or defects in the polymer matrix^{13,14} that enhance the drug release. Other examples exploit the low critical solution temperature of some polymers, which allow them to reduce their volume after increasing the temperature.¹⁵ This feature permits them to behave like a pump expelling the drug as response to the alternant magnetic field.

A new method, which has been less investigated, would melt the polymer matrix of the system where the drug is encapsulated. Thus, when the polymer is melted, the diffusion coefficient would be much higher than the diffusion coefficient of the drug would be higher than below melting temperature.

This drug delivery strategy requires nanoparticles with core-shell structure.^{16,17} The core would provide the magnetic response and the shell would serve to encapsulate the drug. This shell could be fabricated using poly(ϵ -

Correspondence to: J. Rubio-Retama; e-mail: bjrubio@farm.ucm.es

Contract grant sponsor: Spanish Science and Innovation Ministry; contract grant number: MAT2010-15349

Contract grant sponsors: COST Action CM1101, Comunidad de Madrid fellowship (to M.L.)

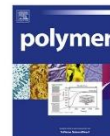
Contract grant sponsor: Spanish Ministry; contract grant number: SAF2008-05412 (to J. Ruiz-Cabello)

Contract grant sponsor: European Commission; contract grant number: FP7-PEOPLE-ITN-264864



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Polymer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/polymer

Influence of the inter-chain hydrogen bonds on the thermoresponsive swelling behavior of UCST-like microgels

D. Serrano-Ruiz^a, P. Alonso-Cristobal^a, M. Laurenti^a, B. Frick^b, E. López-Cabarcos^a, J. Rubio-Retama^{a,*}

^a Department of Physical-Chemistry II, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Institut Laue Langevin, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2013
Received in revised form
26 June 2013
Accepted 27 June 2013
Available online xxx

Keywords:

Thermoresponsive microgels
UCST-like
Hydrogen bonds

ABSTRACT

UCST-like microgels constituted by chains of poly(acrylic acid) (PAAc) and poly(acrylamide) (PAAm) show an intense swelling behavior when they are heated that is not comparable with the observed in neat poly(acrylamide) neither neat poly(acrylic acid) microgels. In order to figure out the microscopic changes that occur within the microgels, we have used quasielastic neutron scattering (QENS) and FTIR-ATR techniques in order to study the polymer dynamics and the chemical groups, which are involved along this process. With QENS we have observed that at 290 K, the co-existence of PAAc and PAAm in the microgels, produced a substantial reduction of the vibrational motion of the polymer chains as well as a reduction of the segmental diffusion coefficient. By contrast when the microgels were heated at 330 K, we observed an increment of the oscillations of the vibrational component as well as a significant increment of the segmental diffusion coefficient. The FTIR-ATR experiments indicated that during the microgel heating, there is a rupture of the intramolecular hydrogen bonds existing between the groups COOH and CONH₂ of neighboring polymer chains. This process is reversible and these interactions reappear again when the system is cooled at 290 K, during the collapse of the microgels.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The synthesis of smart materials capable to respond to external stimuli is one of the most active fields in polymer chemistry. Microgels have been much studied in the last decade due to their small size, which make them to respond quickly to external stimuli. The phenomenon of the gel volume transition in response to external stimuli (for instance, temperature, pH, ionic strength, and electric field) [1–12] has prompted the interest to investigate microgels as potential actuators in different applications in pharmacy [5]. The use of smart materials to control the release of drugs requires to couple external stimuli, like fever, with a change in the polymer matrix that would trigger the drug release [13]. For instance, at human body temperature, the gel would be collapsed retaining the drug entrapped within the polymer network, however, when exceeding a certain temperature the microgel should swell, increasing the pore size and thus allowing the release of the encapsulated substance.

There are two types of thermally responsive microgels, those which exhibit lower critical solution temperature (LCST) like poly(*N*-isopropylacrylamide) or poly(vinylcaprolactone) microgels that collapse by heating [14–18,48], and those, which exhibit an upper critical solution temperature (UCST) and swell in response to an increment of the temperature. Within this behavior, there are some polymers that increase their volume upon heating, showing a sharp sigmoid phase transition over a very narrow range of temperature. This is typically observed in some linear polymers [49], copolymers [50] or mixture of linear copolymers that form polycomplex [51]. However the sharpness of this transition can be faded, when the polymers are chemically cross-linked, giving as result a transition named as UCST-like, which is more a linear increase than a step increase [27,52].

Interpenetrated polymer networks (IPN) based on PAAc and PAAm are one of the few systems that exhibit UCST-like behavior in aqueous solution [19–25]. The origin of this behavior is based on the existence of interactions between the poly(acrylamide) chains and the poly(acrylic acid) which form a polycomplex with a “ladder-loop” structure [54–56]. Later, Tanaka [1] et al., described this interactions as cooperative “zipping” interactions between the molecules, which result from hydrogen bonding and which can be broken

* Corresponding author.

E-mail addresses: bjrubio@ucm.es, rubio-retama@icloud.com (J. Rubio-Retama).

upon heating in aqueous media. These cooperative interactions would provide a non-interrupted linear sequence of bonds that appear between the PAAc and a proton acceptor polymer. For this to happen, the pH of the solution becomes a critical parameter since the interaction occurs below a pH value, where the degree of ionization is low enough [51,57].

Microgels with UCST-like behavior have been studied and characterized using different techniques [26,27]. However, the polymer chains dynamics of these microgels has not yet been investigated. The results of the present work show clearly that the interaction between the polymers chains that constituted the microgels affects strongly the polymer dynamics in such a way that the segmental diffusion coefficient of the polymer chains is enhanced when temperature increases. The reduction of the diffusional motions of the polymer chains at low temperature is concomitant with the formation of interchain interactions between the amide groups of the PAAm and the carboxylic groups of the PAAc chains, thus explaining the reduction of the swelling capacity of the microgel due to these interactions.

2. Experimental section

2.1. Materials

Acrylamide (AAm) and sodium acrylate (AAc) were bought from Panreac. N,N'-methylenebisacrylamide (BIS), ammonium peroxodisulfate, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) and Span 80 were bought from Fluka. The dialysis membrane (12,000–14,000 MWCO) was bought from Spectrum Medical Industries. All reagents were used as received without any further purifications.

2.2. Synthesis of the microgels

Microgels were prepared using the concentrated emulsion polymerization method. The concentrated emulsion was prepared with a low fraction of the oil phase, which constitutes the continuous phase, according to procedures outlined in the literature [28]. Microgels with 100% PAAm or 100% PAAc were obtained following the subsequent procedure: 5 mL of an aqueous solution consisting of AAm (17 mmol/1.25 g) or sodium acrylate (17 mmol/1.6 g), BIS 12.5 mg and ammonium peroxodisulfate (25 mg), was slowly added with a syringe to the continuous oil phase, which was formed with 750 μ L (3.5 mmol) of dodecane and 250 μ L (0.58 mmol) of Span 80. The emulsion was homogenized by mechanical stirring and purged with nitrogen to remove residual oxygen. The polymerization was started by adding TEMED (63 μ L/0.4 mmol) to the emulsion. After 5 h of reaction, the polymer was precipitated and washed several times with cold ethanol. Finally the microgels were isolated by centrifugation (10,000 rpm) for 10 min at 10 °C, freeze-dried and stored. In order to produce microgels constituted by poly(acrylamide) and poly(acrylic acid), part of the monomer was substituted by a specific amount of linear poly(acrylamide) (concentrations are given as mmol of repeated units). The Table 1 shows the microgels composition of each sample.

2.3. Methods

The microgels were studied using scanning electron microscopy (SEM) JEOL JSM-6400 working at an acceleration voltage of 20 kV. The FTIR-ATR spectra were taken with a Nicolet IR200 FTIR spectrometer equipped with an attenuated total reflection (ATR) setup containing ZnSe crystal (Foundation SpeculATR) coupled with a Peltier device (Linkam Scientific). Background spectra were taken before sample spectra and subsequently subtracted. Specifically, for each sample containing 2% (w/w) microgels dispersed in water, an

Table 1
Composition of the synthesized microgel.

Sample name	Aqueous phase				Oil phase		
	AAm (mmol)	AAc (mmol)	Linear PAAm (mmol)	BIS (mmol)	Water (ml)	Span 80 (μ L)	Dodecane (μ L)
Neat PAAm	17	0	0	0.08	5	250	750
PAAc/PAAm 30/70	0	5	12	0.08	5	250	750
PAAc/PAAm 50/50	0	8.5	8.5	0.08	5	250	750
PAAc/PAAm 60/40	0	10	7	0.08	5	250	750
Neat PAAc	0	17	0	0.08	5	250	750

identical solution without the polymer was used as background. The baseline correction was carried out using Igor pro (version 6.22A) by subtracting polynomials to make the baseline flat around the peaks of interest in a similar way as it was described by Cremer et al. [29] The swelling of the microgels was studied with an optical microscope (Leica DM4000) coupled with a Peltier device (Linkam Scientific). For studying the size distribution as a function of temperature, freeze-dried microgels were dispersed in water at the pH of the measurement for 24 h and observed with an optical microscope at different temperatures. Two hundred particles were picked up randomly from optical microscope photographs, and their diameters were measured using ImageJ (v 1.45) to calculate the average diameter [30]. The microgels polymer chains dynamics were studied using incoherent elastic (IES) and quasi-elastic neutron scattering (IQNS). The experiments were performed at the Institute Laue Langevin in Grenoble using the high energy resolution (1 μ eV) neutron backscattering spectrometer IN10, and the cold neutron TOF spectrometer IN5 which provides an elastic energy resolution of 100 μ eV. The outcome in a neutron scattering experiment is the scattering function $S(Q,\omega)$ that contains information about the structure and dynamics of the sample ($Q = 4\pi/\lambda \sin \theta$ is the scattering vector with θ and λ being the half of the scattering angle and the incident neutron wavelength, respectively, and ω is the angular frequency). Quasi-elastic spectra were recorded at 290 K and 330 K using a sample holder with double-wall hollow-cylinder geometry, which was sealed to avoid D₂O evaporation during the measurements. The thickness and concentration of the sample (2% w/w) were selected to yield a transmission of about 85%. Standard ILL procedures and programs were used for corrections (empty cell), normalization, and quasi-elastic peak fit. A more detailed description of the methods has been reported previously [31].

2.4. Theory

From neutron scattering measurements, we obtain the double differential scattering cross section [32] $d^2\sigma/d\Omega dE$ which is proportional to the coherent $S_{\text{coh}}(Q,\omega)$ and the incoherent $S_{\text{inc}}(Q,\omega)$ scattering functions. The incoherent scattering cross section of hydrogen is large in comparison to the coherent and incoherent scattering cross sections of the rest of atoms in the sample such as carbon, oxygen and nitrogen. For PAAc/PAAm microgels the ratio $\sigma_{\text{inc}}(\text{H})/\sigma_{\text{inc}}(\text{total})$ is 0.9997. $S_{\text{inc}}(Q,\omega)$ is measured for the H atoms and hence, we can infer the dynamics of the polymeric chains to which the H atoms are attached [33,34]. The incoherent cross section of ^2H is low (2.05 barn) as compared to ^1H (80.26 barn). However, although this contribution is small in diluted samples it is relevant since the amount of incoherent scattering coming from the heavy water used as solvent is of the same order of magnitude than

the signal arising from the hydrogels. Nevertheless, the dynamics of the heavy water molecules are much faster than the dynamics of the polymer chains and both contributions can be distinguished.

Dynamics in polymeric systems result from the superposition of vibrations, rotations and translational motions [35–37]. We assume that the time scales are sufficiently different to be uncoupled, such that in IQNS spectra features characteristic of these different motions appear at separate ω -regions. Furthermore, any rotational motion is normally very fast on the translational motions time scale, forming a low intensity flat background that can be separated when using a high resolution spectrometer like IN10. For data analysis we have considered that molecular motion in the experimental energy range is composed by the combination of vibrational and diffusive processes, which are related in this study with the average of the segmental diffusion coefficient characteristic of cooperative motions that appear in densely packed polymer chains in a solvent [18,53,54].

Vibrational motions for polymers are uncoupled from other motions and the incoherent scattering function $S_{\text{inc}}(Q, \omega)$ can be described by;

$$S_{\text{inc}}(Q, \omega) = S_{\text{inc}}^{\text{vib}}(Q, \omega) \otimes S_{\text{inc}}^{\text{seg}}(Q, \omega) \quad (1)$$

where \otimes means the convolution product (provided that the inelastic contribution is well separated from the quasielastic one). $S_{\text{inc}}^{\text{vib}}(Q, \omega)$ is the incoherent scattering function for vibrational motion, corresponding to the elastic Debye–Waller factor. It can be approximated to

$$S_{\text{inc}}^{\text{vib}}(Q, \omega = 0) = e^{-\frac{1}{3}\langle u^2 \rangle Q^2} \cdot \delta\omega \quad (2)$$

where $\langle u^2 \rangle$ is the mean square amplitude of the proton vibration, Q the scattering vector, and $\delta\omega$ is the Dirac's delta function. For diffusive processes $S_{\text{inc}}^{\text{seg}}$ is given by a quasielastic contribution

$$S_{\text{inc}}^{\text{seg}}(Q, \omega) = L(\omega, \Gamma(Q)) \quad (3)$$

where $L(\omega, \Gamma(Q))$ is a Lorentzian function with half-width at half-maximum $\Gamma(Q)$. Since $\Gamma(Q) = \hbar \cdot D_c \cdot Q^2$ for Fickian diffusion (D_c is the diffusion coefficient characteristic of the segmental dynamics), the incoherent scattering function can be finally written as;

$$S_{\text{inc}}(Q, \omega) = e^{-\frac{1}{3}\langle u^2 \rangle Q^2} \cdot \delta\omega \otimes \frac{1}{\pi} \left(\frac{DQ^2}{(DQ^2)^2 + \omega^2} \right) \quad (4)$$

The spatial scale of the vibrational motion (root mean square amplitude $\langle u^2 \rangle^{1/2}$) is obtained from $S_{\text{inc}}(Q, \omega = 0)$ at fixed temperature and D_c can be derived from the fitting of the quasielastic component of the IQNS patterns.

3. Results and discussion

After polymerizing the internal phase of the concentrated emulsion, we obtained microgels with a mean diameter close to 5 μm and spherical shape as it was revealed by SEM, see Fig. 1.

The response of these microgels against the temperature is strongly affected by the solution pH, because within the matrix there are carboxylic groups that can be protonated and therefore modifying the electrostatic interactions within the microgels. With the aim of determining the optimum pH at which the swelling is boosted by the temperature, we have measured the diameter of de PAAc/PAAm microgels at different pH. The Fig. 2 depicts the diameter of the PAAc/PAAm 50/50 microgels as a function of the temperature and the pH.

In Fig. 2A, it is shown the maximum relative swelling as a function of the pH reached by the microgels after heating them to 340 K. Here it is depicted that the variation of the volume is higher when the microgels are at lowest pH used in this experiments (pH 3). This result points out the requirement of having protonated carboxylic groups within the microgels to have a marked thermal responsiveness. This is in agreement with a previous work published by Owens et al. [5]. Some authors like Sudre et al. [51], have associated the requirement of having low pH as a requisite to establish the interaction between the PAAc and the PAA chains, in this way, the pH of the solution would affect the index of interaction between the PAAc and the PAAm and consequently the response of the microgels against temperature.

In order to evaluate the effect of the microgel composition in the thermal response, we studied the relative swelling of microgels with different compositions as a function of the temperature. The microgels were dispersed in water at pH 3, since at this pH majority of the carboxylic groups would be protonated. As it is shown in Fig. 2B the microgels exhibit a big difference in size upon heating and this effect depends strongly on their composition. In fact, it was

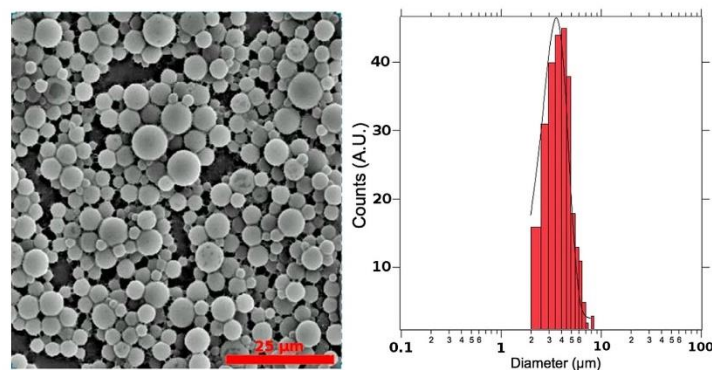


Fig. 1. On the left, representative SEM micrograph of microgels (PAAc/PAAm 50/50) prepared by concentrated emulsion polymerization. On the right, size distribution of the microgels under the conditions of the SEM vacuum chamber.

Please cite this article in press as: Serrano-Ruiz D, et al., Influence of the inter-chain hydrogen bonds on the thermoresponsive swelling behavior of UCST-like microgels, Polymer (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.06.057>

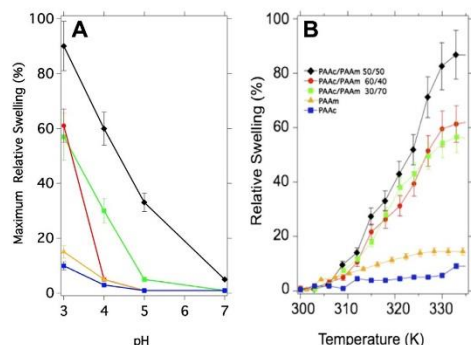


Fig. 2. A) Maximum Relative Swelling of microgels with different composition as a function of the pH. B) Relative swelling of microgels with different polymer composition as a function of temperature.

observed that neat PAAc microgels or neat PAAm microgels increased slightly their volumes after heating. By contrast, the increments of the volumes observed in microgels constituted by chains of poly(acrylamide) and poly(acrylic acid) were up to six fold larger than the observed in the previous ones. These results indicate that the coexistence of PAAc and PAAm in the same matrix provoke a reduction of the swelling degree that is partially reverted after increasing the temperature of the media.

According to Flory, the microgel swelling is governed by three terms: polymer network elasticity (elastic term), solubility (mixing term), and mesh charge (ionic term) [38–41]. The first term competes against the other two to shrink the microgels. In the synthesized microgels, the coexistence of PAAc and PAAm chains reduces the swelling degree, and this fact could be explained as an increment of the elastic term of the polymer network due to the formation of interactions between both polymer chains. To test this hypothesis from a microscopic point of view, we have studied the dynamic of the microgels using IQNS. From the measurements we obtained $S_{inc}(Q, \omega)$ for the H atoms that form the polymer chains, which would include H atoms provided by residual molecules of water that hydrate the polymer chains. Hence, we would be able to infer the dynamics of the hydrated-polymeric chains to which the H atoms are attached. When the objects of study are microgel dispersions in D_2O , the incoherent and coherent scattering signals of the solvent must be separated from those arising from the sample. The backscattering or time-of-flight instruments do not allow discrimination between coherent and incoherent scattering and, thus, measurements contain both contributions. However, the bulk liquid water coherent-scattering predominantly appears concentrated at the intermolecular O–H peaks at $Q = 1.8$ and 3.3 \AA^{-1} [42]. On the other hand, the first crystalline peak of ice, the (110) reflection, appears at $Q = 1.597 \text{ \AA}^{-1}$ [43]. Taking this into account, it was possible to get rid of most of the water coherent scattering performing the experiments placing the detectors at Q values below 1.5 \AA^{-1} where no water structure is observed and the coherent contribution is very small. However, the data are presented as $S(Q, \omega)$ instead of $S_{inc}(Q, \omega)$ because some coherent scattering can slightly contribute at the higher Q values.

Inelastic neutron scattering was employed to extract space and time-dependent information about the microscopic dynamics [35,37,44]. The elastic neutron-scattering function $S(Q, 0)$ was measured as a function of temperature with IN10 using the so called “fixed elastic window” method [35]. The elastic scans provide

an overview about the temperature dependence of the molecular dynamics. From this, we have determined the spatial scale of the vibrational motion of the particles (mostly hydrogen), the mean square displacement $\langle u^2 \rangle$, which is obtained after analyzing the Q dependence of $S_{inc}(Q, 0)$ at fixed temperature normalized to its value at 190 K given by Equation (5).

$$\ln \frac{S_{inc}(Q, 0)}{S_{inc}(Q, 0)_{190 \text{ K}}} = \frac{1}{3} \left(\langle u^2(T) \rangle - \langle u^2(190 \text{ K}) \rangle \right) \cdot Q^2 \quad (5)$$

$S_{inc}(Q, 0)_{190 \text{ K}}$ is the elastic scattering at 190 K, well below the freezing temperature of the aqueous microgel dispersion where it is supposed there are no motions of the polymer chains since they are entrapped within the ice water.

In Fig. 3, we show the $\langle u^2(T) \rangle - \langle u^2(190 \text{ K}) \rangle$, termed $\Delta \langle u^2 \rangle$, obtained for different samples as a function of the temperature.

Above 270 K, the oscillation vibrational amplitude increases abruptly, due to the D_2O melting that allows the activation of movements within the polymer chains. In this temperature region, one can observe a substantial difference in the oscillations of the vibrational amplitude of the different samples. At 290 K, $\Delta \langle u^2 \rangle$ ($\sim 5 \text{ \AA}^2$) for neat PAAm microgels and ($\sim 1 \text{ \AA}^2$) for PAAc respectively. This difference could be attributed to the fact that at acidic pH, PAAc chains are not fully solvated making them to behave like a semisolid, similar values have been found in case of PNIPAM polymers above its volume phase transition, where the PNIPAM chains are collapsed and have lost the molecules of water that solvate them. In case of PAAc/PAAm 50/50 microgels, the value is around 1.5 \AA^2 , which shows the great influence of the microgel composition in the mean square displacement of the polymer segments, which seem to be hampered when PAAc and PAAm coexist within the polymer network. From 277 K to 330 K, $\Delta \langle u^2 \rangle$ increases with temperature for all the samples. Interestingly, the PAAc/PAAm 50/50 and PAAc/PAAm 60/40 microgels showed two slopes, one in the range between 270 K and 310 K, which is characterized by a rapid increment of the $\Delta \langle u^2 \rangle$ and a second slope, from 310 K to 330 K, which is less pronounced. The increase of $\langle u^2 \rangle$ indicates a gain of freedom of movement when increasing temperature that is faster at the beginning than at the end of the experiment. We could explain this behavior as a result of the existence of interactions between the PAAc and the PAAm polymer chains. Such interactions could make the PAAm chains to loss freedom of movement, what would reduce the vibrational oscillation amplitude of the whole system. When the system is heated these interactions begin to diminish, rendering a loss of rigidity and a rapid increment of the oscillations of the vibrational amplitude. The freedom of movement reaches the maximum value at 310 K, from which the polymer network could not gain more vibrational amplitude since the crosslinker agent would impose restrictions to the movement of the polymer chains that the temperature cannot overcome.

Taking into account the presence of these two regions, we have investigated with IN10 the IQNS at 290 K and 330 K. However, as it was stated before, a possible contribution to the hydrated-polymer incoherent scattering signal could arise from the incoherent scattering of the bulk water. In our experiments the $\sigma_{inc}(\text{microgels})/\sigma_{inc}(\text{total})$ is 0.54 and the rest of the incoherent signal comes from the solvent (D_2O). Nevertheless, the D_2O dynamics is about 2 orders of magnitude faster than the polymer dynamics. To corroborate this assertion we have performed measurements using IN5 since the energy range of this instrument permits to observe the contribution of bulk water and hydrated-polymer to the incoherent scattering, and because of the different time scales of solvent and main polymer dynamics, the solvent contribution can be removed. Fig. 4 shows the IQNS spectra of the PAAc/PAAm

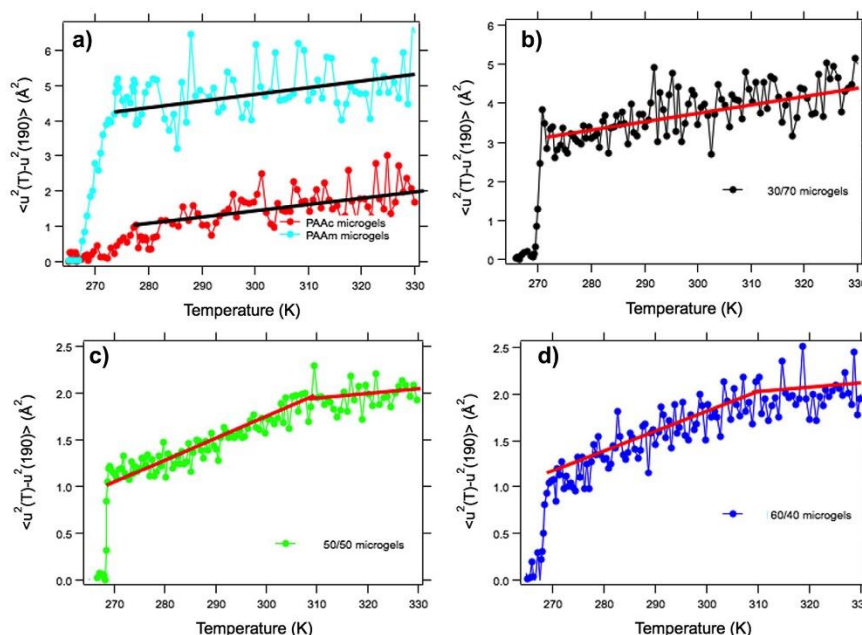


Fig. 3. Oscillations of the vibrational amplitude as a function of the temperature of the polymer networks, a) neat PAAc and neat PAAm microgels, b) PAAc/PAAm 30/70, c) PAAc/PAAm 50/50, d) PAAc/PAAm 60/40. The heating rate was 0.4 K/min.

50/50 microgels solution at 290 K and 330 K measured in IN5. At 290 K water gave a quasi-elastic contribution in the energy range of the meV that broadens as the temperature increases up to 330 K.

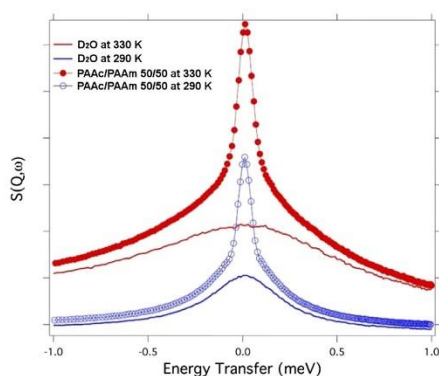


Fig. 4. Quasi-elastic neutron scattering spectra recorded at IN5 at $Q = 0.45 \text{ \AA}^{-1}$ for PAAc/PAAm 50/50 microgels at 290 K (blue points) and 330 K (red points) respectively. The lines below are the experimental results of quasi-elastic neutron scattering spectra of D_2O measured at the same conditions that the microgels. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In Fig. 4, we can observe that the scattering of the microgels dispersion is the result of two components, the dynamics of the water molecules and the hydrated-polymer chains dynamics. At 330 K, the microgel is in the swollen state producing a broadening in the polymer scattering contribution around the elastic peak compared with those obtained at 290 K whereas the D_2O contribution widens due to the increment in the mobility of the water molecules. The spectra collected in IN5 shows that the contribution of the solvent to the incoherent scattering can be separated as a constant background at the $\pm 15 \text{ meV}$ window of IN10.

For densely packed polymer chains, like the polymer chains within the microgels, the observed average segmental diffusion coefficient would be mainly due to cooperative motions of the polymer chains, which have been also named as breathing modes [18,53] and which have a relaxation rate Γ of the process: $\Gamma(Q) = (\hbar/2\pi) \cdot DQ^2$. The Fig. 5 shows the spectra obtained in IN10 at the two temperatures studied and at different Q values. From the fitting with a Lorentzian function, we obtained the half-width at half-maximum $\Gamma(Q)$.

Contrary to PNIPAM microgels [31], the variation of D follows the same tendency to most solids and liquids for which D increases when temperature is raised. The Fig. 6A depicts the segmental diffusion coefficient as a function of the microgel composition for the two temperatures studied. Interestingly, when samples with different compositions were analyzed we observed a strong influence of polymer composition on the translational diffusion coefficient.

Independently of the temperature, we can observe that the segmental diffusion coefficient strongly depends on the polymer composition in such a way that it diminishes when the ratio of PAAc

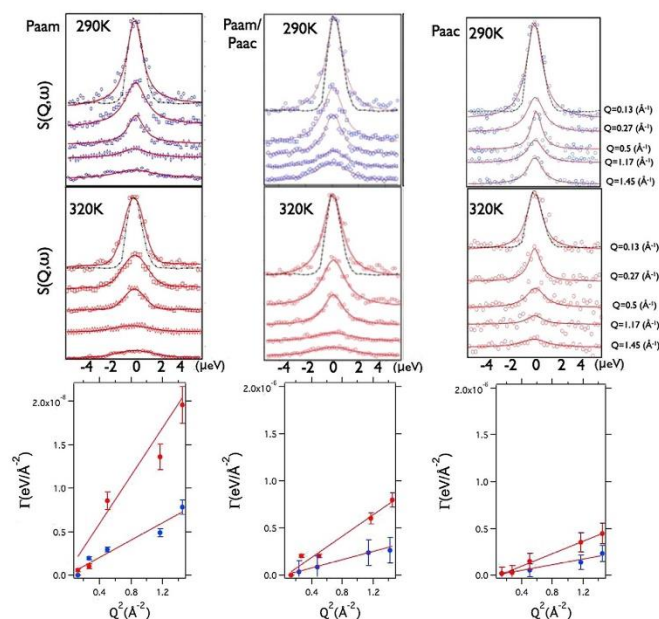


Fig. 5. The $S(Q, \omega)$ function of PAAm, PAAm/PAAc 50/50 and PAAc microgels in the collapsed (290 K) and in the swollen (327 K) state, the dashed line represents the resolution function of the instrument. At the bottom part, the Half-width at half-maximum $\Gamma(Q)$ of the Lorentzian quasielastic component measured in IN10 spectrometer as a function of Q^2 for the different compositions at 290 K (blue circles) and at 330 K (red circles). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

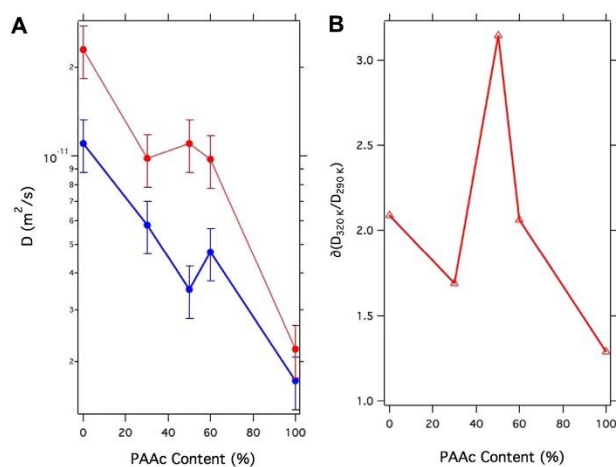


Fig. 6. A) Translational diffusion coefficient at 290 K (blue points) and 330 K (red points) for microgels with different compositions. B) Ratio between the translational diffusion coefficients obtained at the highest and the lowest temperatures. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article in press as: Serrano-Ruiz D, et al., Influence of the inter-chain hydrogen bonds on the thermoresponsive swelling behavior of UCST-like microgels, Polymer (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.06.057>

increases in the microgel composition. Interestingly, the ratio between the diffusion coefficients obtained at 330 K and at 290 K showed a conspicuous increment for the PAAm/PAAc 50/50 microgels (see Fig. 6B). That could be due to the fact that interactions would act as cross-linkers, increasing the elastic tension, stabilizing the matrix and hindering the movement of the polymer segments. In addition, the increment of the elastic tension would reduce the swelling of these microgels, which is in agreement with the macroscopic observations. By contrast, an increment of the temperature would provoke the rupture of the inter-chain interactions, thus increasing the polymer chains dynamics and resulting in an increment of diffusional coefficients.

To deepen the understanding of such interactions we have used IR spectroscopy since this technique is highly sensitive to the local environment of the molecules, specially the vibration of the amide and the acrylic acid groups. The Fig. 7 depicts the FTIR-ATR spectra for neat PAAm, neat PAAc and PAAc/PAAm 50/50 microgels in the collapsed (290 K) and in the swollen (330 K) state.

The spectrum of the neat PAAm microgels (Fig. 7a and b) revealed the presence of two prominent bands on the region between 1550 and 1800 cm^{-1} , which correspond with the amide II (contribution of N–H \sim 60% bending and C–N \sim 40% stretching vibration) and the amide I (containing contributions from the C=O

stretching vibration \sim 80% with a minor contribution from the C–N stretching vibration). Following Maeda's works [45,46], it is possible to collect information about the interactions of the amide groups by analyzing the profile of the spectrum in this region. Using this methodology, we observed a single Gaussian component centered at 1606 cm^{-1} , which was assigned to the amide II band. As it was shown in previous papers [46,47], the amide I band of PAAm in water can be decomposed in two bands centered at 1637 and 1666 cm^{-1} , which can be assigned to the C=O groups bound to water (C=O...H–O) and to the amide N–H groups (C=O...H–N) through H bonding, respectively.

In addition we analyzed the IR spectrum of neat PAAc microgels, (Fig. 7c and d) and in these samples we observed an intense peak at 1712 cm^{-1} due to the stretching of carbonyl group (C=O), which can be fitted with a single Gaussian component. IR spectra from neat PAAm and neat PAAc remained unchanged when the temperature was increased to 330 K. The lack of changes suggests that the environment around these groups was almost identical in the studied range of temperatures. By contrast for PAAc/PAAm microgels (Fig. 7e and f), we observed a substantial change in the IR spectra, which presented two components, one that stemmed from the PAAm part and the other from the PAAc counterpart. The analysis of the PAAm part denoted the existence of the amide II

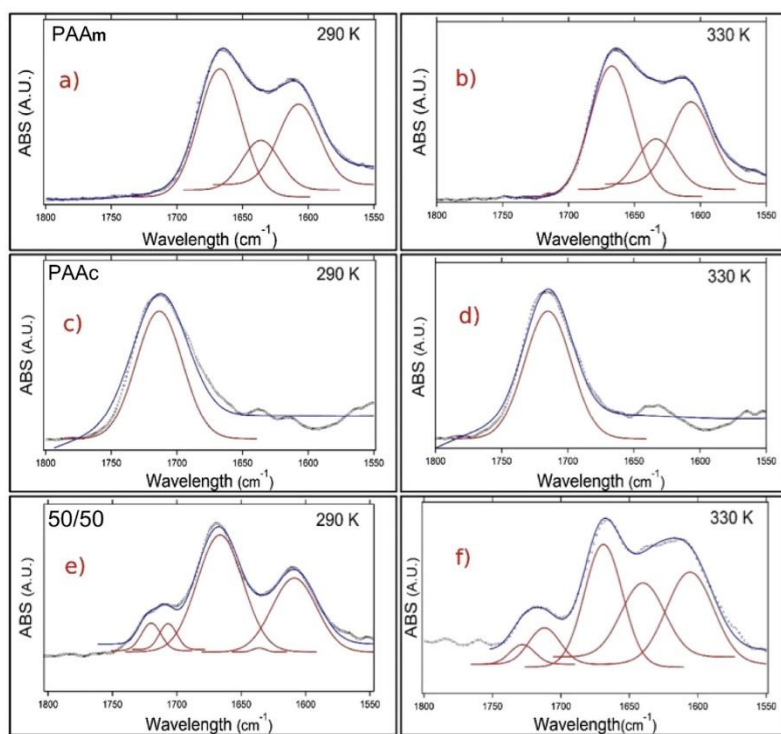
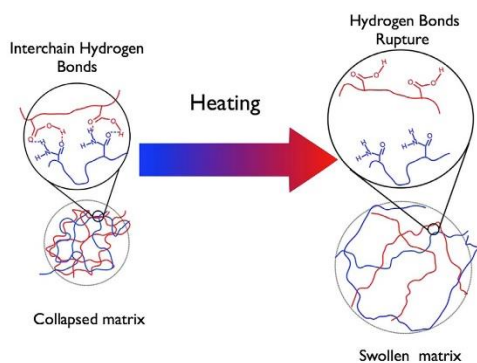


Fig. 7. FTIR-ATR spectra of microgels dispersion formed by a) neat PAAm microgels at 290 K, b) neat PAAm microgels at 330 K, c) neat PAAc microgels at 290 K, d) neat PAAc microgels at 330 K, e) PAAc/PAAm 50/50 microgels at 290 K, and f) PAAc/PAAm 50/50 microgels at 330 K. The red line represents the fitting of each band and the blue line shows the result of the fitting. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article in press as: Serrano-Ruiz D, et al., Influence of the inter-chain hydrogen bonds on the thermoresponsive swelling behavior of UCST-like microgels, Polymer (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.06.057>



Scheme 1. PAAm/PAAc matrix at low and high temperatures.

component, which is formed by a single Gaussian band at 1605 cm^{-1} and the amide I component, which was fitted with two Gaussian components, one centered at 1635 cm^{-1} attributed to the $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ interaction and other at 1665 cm^{-1} associated to the $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ interaction. When we compared the intensity of the band centered at 1635 cm^{-1} attributed to fewer water molecules interacting with the carbonyl groups. Additional experiments carried out in dried neat PAAm microgels demonstrated the absence of this band, that would confirm its relation with the presence of water in the polymer structure. Furthermore, the profile of the bands of the PAAc component highlighted that the environment around the carboxylic groups changed in the PAAc/PAAm 50/50 networks when comparing it with the FTIR spectra of the neat PAAc microgels. Within the PAAc/PAAm 50/50 network, the carboxylic band is split in two Gaussian components, one centered at 1724 cm^{-1} and other centered at 1710 cm^{-1} . Taking into account that pure PAAc microgels in water shown a single Gaussian component at 1712 cm^{-1} , this new band is the result of the interaction between some of the carboxylic groups with the $\text{N}-\text{H}$ groups of the PAAm chains.

By contrast, when the PAAc/PAAm 50/50 matrix was heated the bands changed substantially since the environment around the groups varied. Thus for instance, the intensity of the amide I peak located at 1635 cm^{-1} , which is attributed to the $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ increased tremendously. This change could be related with the fact that at higher temperature the $\text{C}=\text{O}$ groups of the PAAc could break their interactions with $\text{H}-\text{N}$ groups of the PAAm leading the polymer matrix to swell, thus permitting the gradual replacement of $\text{H}-\text{N}$ groups. The differential analysis of the PAAc/PAAm 50/50 IR spectra at 290 K and 330 K point out the increment of the intensity of the band arising at 1635 cm^{-1} whereas the band at 1724 cm^{-1} diminished, which would prove the formation of new bonds with water and the rupture of the former $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ interaction.

Complementary to this effect, it is observed a significant variation in the molar fraction of the carboxylic groups that interact with the PAAm chains (X_{COOH}). This fraction can be calculated as follows:

$$X_{\text{COOH}} = \frac{\text{Area}_{1712\text{ cm}^{-1}}}{\text{Area}_{1712\text{ cm}^{-1}} + \text{Area}_{1724\text{ cm}^{-1}}} \quad (6)$$

Thus, we can infer that the fraction of carboxylic groups that interact with PAAm changed from 0.62 to 0.25 when the temperature raised from 290 K to 330 K, confirming the result of the

rupture of the $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ interactions, which would occur upon increasing the temperature. As consequence the polymer matrix would reduce the intra-chain interactions providing a mayor swelling capacity to the microgel. In summary, the IR-spectra would indicate that the increment of the temperature was concomitant with a variation of the polymer environment of the IPN network. The Scheme 1 depicts the matrix configuration for IPN matrix at low and high temperatures.

The network composed by PAAm and PAAc shows clear evidences of inter-chains interactions at 290 K, which are broken at 330 K permitting the partial replacement of the $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ interactions by $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ interactions, which would yield an increment of the swelling ratio. We can conclude that the collapsed state of the PAAm/PAAc matrix is mainly due to the existence of hydrogen bonds between the polymer chains that constitute the network, although it is not discarded an additional contribution arising from interchain hydrophobic interactions at 290 K due to the proximity of the polymer backbones.

4. Conclusions

In this work, we have studied from the macroscopic and microscopic point of view, the swelling behavior as a function of the temperature of microgels constituted by PAAm and PAAc chains at different composition. This parameter seems to be crucial to obtain thermal response since the presence of the two components within the matrix is required to establish reversible interactions that control the swelling degree of the microgels. These interactions appear specifically between the CONH_2 groups of the PAAm and the COOH groups of the PAAc. The necessity of having protonated COOH groups makes this swelling behavior pH dependent. When these two requirements (pH and composition) are fulfilled, the PAAm/PAAc microgels present a continuous volume phase transition that is triggered by the temperature, which results in a conspicuous increment of the relative swelling of the microgels after heating. Neutron scattering measurements of the microgel matrix revealed interesting characteristics of the polymer chains dynamics. Thus for instance, the $\Delta\langle u^2 \rangle$ is affected by the polymer matrix composition in such a way that when inter-polymer interactions appear the $\Delta\langle u^2 \rangle$ diminishes. A similar trend was also observed for the segmental diffusion coefficient of the polymer chains. At 290 K the polymer chains have a restriction of the movement freedom that can be partially reverted after increasing the temperature. These movement restrictions were studied by FT-IR. The analysis of the IR spectra manifests the presence of inter-chains interactions between the $\text{C}=\text{O}$ groups of the PAAc and the NH_2 moiety of the PAAm at 290 K. These groups would interact through hydrogen bonding ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$) yielding as result an increment of the elastic tension of the microgels. On the other hand, the increment of the temperature seems to break partially these interactions, permitting the microgels to relax and swell.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Science and Innovation Ministry (Grant MAT2010-15349) and from COST Action CM1101. Paulino Alonso-Cristobal acknowledges the Spanish Research Ministry for an FPU fellowship to perform this work. Marco Laurenti acknowledges the Comunidad de Madrid for a fellowship to perform this work.

References

- [1] Iilmäin F, Tanaka T, Kokufuta E. Nature 1990;349:400.
- [2] Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. Prog Polym Sci 2010;35:174.

- [3] Dimitrov I, Trzebicka B, Müller AHE, Dworak A, Tsvetanov CB. *Prog Polym Sci* 2007;32:1275.
- [4] Rubio-Retama J, López-Cabarcos E, López-Ruiz B. *Biomaterials* 2003;24:2965.
- [5] Owens III DE, Jian Y, Fang JE, Slaughter BV, Chen Y, Peppas NA. *Macromolecules* 2007;40:7306.
- [6] Liu T, Hu S, Liu D, Chen S, Chen I. *Nano Today* 2009;4:52.
- [7] Ward MA, Georgiou TK. *Polymers* 2011;3:1215.
- [8] Meng F, Zhong Z, Feijen J. *Biomacromolecules* 2009;10:2.
- [9] Daly E, Saunders BR. *Langmuir* 2000;16:5546.
- [10] Nerupuri V, Keddie JL, Vincent B, Busnak IA. *Langmuir* 2006;22:5036.
- [11] Meunier F, Elaissari A, Pichot C. *Polym Adv Technol* 1994;6:489.
- [12] Kang M, Pastoriza-Santos I, Rodríguez-González B, Klitzing R, Wellert S, Hellweg T. *Langmuir* 2008;24:6300.
- [13] Fernández-Barbero A, Suárez I, Sierra-Martín B, Fernández-Nieves A, Nieves FJ, Marquez M, et al. *Adv Colloid Interface Sci* 2009;147:88.
- [14] Pelton R. *Adv Colloid Interface Sci* 2000;85:1.
- [15] Brazel CS, Peppas NA. *Macromolecules* 1995;28:8016.
- [16] Zhang J, Peppas NA. *Macromolecules* 2000;33:102.
- [17] Hellweg T, Dewhurst CD, Eimer W, Kratz K. *Langmuir* 2004;20:4330.
- [18] Adelsberger J, Kulkarni A, Jain A, Wang W, Bivigou-Koumba AM, Busch P, et al. *Macromolecules* 2010;43:2490.
- [19] Yoshimitsu H, Kanazawa A, Kanaoka S, Aoshima S. *Macromolecules* 2012;45(23):9427.
- [20] Seuring J, Agarwal S. *Macromol Rapid Commun* 2012;33(22):1898.
- [21] Zhang Q, Schattling P, Theato P, Hoogenboom R. *Polym Chem* 2012;3(6):1418.
- [22] Seuring J, Agarwal S. *Macromolecules* 2012;45(9):3910.
- [23] Seuring J, Bayer F, Huber K, Agarwal S. *Macromolecules* 2012;45(1):374.
- [24] Diehl C, Dambowsky I, Hoogenboom R, Schlaad H. *Macromol Rapid Commun* 2011;32(21):1753.
- [25] Can A, Hoepfner S, Guillet P, Gohy J-F, Hoogenboom R, Schubert US. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2011;49(17):3681.
- [26] Okano T. *Adv Polym Sci* 1992;110:179.
- [27] Echeverría C, López D, Mijangos C. *Macromolecules* 2009;42:9118.
- [28] Rubio-Retama J, López-Cabarcos E, López-Ruiz B. *Talanta* 2005;68:99.
- [29] Sagie LB, Zhang Y, Vladislav AL, Chen X, Cho Y, Cremer PS. *J Am Chem Soc* 2009;132:9304.
- [30] Rubio-Retama J, Tamimi FM, Heinrich M, López-Cabarcos E. *Langmuir* 2007;23:8538.
- [31] Rubio-Retama J, Frick B, Seydel T, Stamm M, Fernandez-Barbero A, López-Cabarcos E. *Macromolecules* 2008;41:4739.
- [32] Colmenero J, Arbe A. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 2013;51:87.
- [33] Arbe A, Alegría A, Colmenero J. *Macromolecules* 1999;32:7572.
- [34] Pérez R, Arbe A, Colmenero J, Frick B, Willner L, Richter D, Fetters LJ. *Macromolecules* 2006;39:1060.
- [35] Bee M, Hilger A. *Quasielastic neutron scattering*. Bristol: IOP; 1988.
- [36] López-Cabarcos E, Batallán F, Frick B, Ezquerro T, Baltá-Calleja F. *J Phys Rev B* 1994;50:13214.
- [37] Ryon-Joon R. *Methods of X-ray and neutron scattering in polymer science*. New York: Oxford University Press, Inc.; 2000.
- [38] Flory PJ. *Principles of polymer chemistry*. London: Cornell University Press; 1953.
- [39] Hirotsu S. *Phase Transitions* 1994;47:183.
- [40] Hiemenz PC, Rajagopalan R. *Principles of colloid and surface chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1997.
- [41] Shibayama M, Tanaka T. In: *Advances in polymer science*. Berlin: Springer-Verlag; 1993.
- [42] Petkov V, Peng Y, Williams G, Huang B, Tomalia D, Ren Y. *Phys Rev B* 2005;72:195402.
- [43] Wollan EO, Davidson I, Shull CG. *Phys Rev* 1949;75:1348.
- [44] Tyagi M, Arbe A, Alegría A, Colmenero J, Frick B. *Macromolecules* 2007;40:4568.
- [45] Yamauchi H, Maeda Y. *J Phys Chem B* 2007;111:12964.
- [46] Maeda Y, Higuchi T, Ikeda I. *Langmuir* 2000;16:7503.
- [47] Rubio-Retama J, Zafeiropoulos N, Frick B, Seydel T, López-Cabarcos E. *Langmuir* 2010;26:7101.
- [48] Liétor-Santos JJ, Gasser U, Zhou J, Hu Z, Fernández-Nieves A. *Crystal of microgel particles*. In: *Hydrogel micro and nanoparticles*. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA; 2012.
- [49] Plamper FA, Schmalz A, Ballauff M, Müller AHE. *J Am Chem Soc* 2007;129(47):14538–9.
- [50] Meiswinkel G, Ritter H. *Macromol Rapid Commun* 2013;34:1026.
- [51] Sudre G, Tran Y, Creton C, Hourdet D. *Polymer* 2012;53(2):379–85.
- [52] Echeverría C, Peppas NA, Mijangos C. *Soft Matter* 2012;8:337–46.
- [53] Farago B, Monkenbusch M, Ritter D, Huang JS, Fetters LJ, Gast AP. *Phys Rev Lett* 1993;71:1015.
- [54] Baranovsky VYu, Kazarin LA, Litmanovich AA, Papisov IM. *Eur Polym J* 1984;20:191.
- [55] Eustace DJ, Siano DB, Drake EN. *J Appl Polym Sci* 1988;35:707.
- [56] Klenina OV, Fain EG. *Polym Sci U.S.S.R* 1981;23:1439.
- [57] Aoki T, Kawashima M, Katono H, Sanui K, Ogata N, Okano T, et al. *Macromolecules* 1994;27:947.